

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária



Dissertação

Determinação da paternidade de leitegadas suínas por marcadores microssatélites utilizando inseminação heterospérmica, com deposição espermática intracervical e intrauterina, para a verificação da contribuição individual de machos suínos.

Andrea Panzardi

Pelotas 2006

Andrea Panzardi

Determinação da paternidade de leitegadas suínas por marcadores microssatélites utilizando inseminação heterospérmica, com deposição espermática intracervical e intrauterina, para a verificação da contribuição individual de machos suínos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área de conhecimento: Reprodução Animal).

Orientador: Thomaz Lucia Junior

Co - Orientador: João Carlos Deschamps

Pelotas, 2006

Banca Examinadora

Prof. Thomaz Lucia Jr.

Prof. Eduardo Gonçalves Xavier

Prof. Heden Luiz Marques Moreira

Prof. João Carlos Deschamps

Dedico este trabalho a todos meus familiares, principalmente aos meus pais, que sempre me apoiaram e me incentivaram em minhas decisões, permitindo que eu conseguisse realizar mais uma etapa de minha vida.

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus pais Antonio Carlos Panzardi e Suely Rose Panzardi, por ser hoje o que sou, pela confiança dedicada a mim, por tudo que conquistei, e que ainda terei de conquistar.

Agradeço ainda, a minha irmã Ana Elisa Panzardi e meu irmão Marcelo Panzardi, pela preocupação e amor dedicado a mim por todos esses anos.

Aos meus cunhados Denis Dias e Mariana Arjonas Panzardi, pela amizade, carinho e apoio.

À minha Madrinha Nádia Lombardi e meu Tio avô Oswaldo Lombardi pela preocupação constante comigo, amor, e imenso carinho por mim.

Agradeço a minha grande amiga Lígia Maria Piassi pelo companheirismo, amizade e carinho durante esses 2 anos, e seu acolhimento nos momentos mais difíceis.

Ao meu amigo Marcus Vinícius Figueira de Alvarenga, pelo acolhimento durante os primeiros meses de estada em Pelotas.

Agradeço ainda a meus amigos Antonio Sérgio Varella Junior, Carine Dahl Corcini, Elisângela Madeira Mirapalheta pelo auxílio, amizade e companheirismo; e a todos integrantes e ex-integrantes do Grupo PIGPEL, que tive a oportunidade de conhecer e conviver.

Ao meu Orientador Thomaz Lucia Junior, pela convivência e confiança durante esses 2 anos.

Ao Prof ° João Carlos Deschamps, pela co-orientação exercida durante este período.

À Universidade Federal de Pelotas que me permitiu ingressar no Curso de Pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Bolsa de estudos concedida para a execução desta dissertação.

A todos funcionários, professores, alunos, que de alguma forma me auxiliaram em algum momento na execução do meu experimento.

A todos laboratórios do Centro de Biotecnologia (Cenbiot) que me cederam não somente materiais, como muito conhecimento e convívio. Em especial gostaria de agradecer ao Luciano Pinto e a Roberta Mattos Collares Bressel, pela paciência e compreensão durante o decorrer de meu experimento.

Resumo

ANDREA PANZARDI, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006. **Utilização de marcadores microssatélites na determinação da contribuição individual de machos suínos, para a paternidade de leitegadas produzidas por inseminação artificial intracervical e intra-uterina.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Veterinária. Orientador: Lucia, Thomaz, Jr.

A possibilidade de redução no volume e concentração da dose inseminante (DI) na inseminação intra-uterina (IAIU), permite um melhor aproveitamento do reprodutor suíno em um maior número de fêmeas. Porém, o uso freqüente de *pools* de 2 ou mais machos na inseminação heterospermica pode mascarar o baixo desempenho de alguns reprodutores. O objetivo deste estudo foi comparar o uso de IAIU com a inseminação artificial intracervical (IAIC), tanto em condições de rotina de granja, como através da determinação genética da paternidade em amostras heterospermicas de sêmen para identificar o desempenho reprodutivo de machos individuais. Foram utilizadas 300 fêmeas de ordem de parto (OP) 2-5, submetidas a IAIC e IAIU, com doses inseminantes com concentração de $3,0 \times 10^9$ espermatozoides/85 ml e $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/60 ml, respectivamente. Para o teste de paternidade foram utilizados 9 microssatélites (SW24, SW951, SW857, SO386, SO101, SO090, SW240, SO155, SO355). O SW24 apresentou-se monomórfico e o SO090 não apresentou amplificação alguma. Foram genotipadas 25 leitegadas, totalizando 300 leitões, e havendo exclusão de paternidade somente em 95 deles. O teste de campo evidenciou desvantagem da IAIU ($P < 0,05$), em termos de taxa de concepção (90,7%) e parição (85,3%), em comparação com a IAIC (98,7% e 94,7%, respectivamente). Porém, o tamanho total da leitegada para IAIC (13,7) e IAIU (13,0) não diferiu ($P > 0,05$). A exclusão de paternidade não permitiu diferenciação entre os machos, dentro das técnicas de IA, possivelmente em função da similaridade genética observada no plantel comercial avaliado.

Palavras chaves: inseminação artificial intra-uterina, teste de paternidade, PCR multiplex, marcadores microssatélites, suínos.

Abstract

ANDREA PANZARDI, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006. **Use of microsatellites to determine the individual contribution of boars for the paternity of litters generated by cervical and intra-uterine artificial insemination.**

M.S. Dissertation (M.S. in Veterinary Medicine). Faculdade de Veterinária. Advisor: Lucia, Thomaz, Jr.

The possibility of using reduced sperm concentration with intra-uterine artificial insemination (IUI) allows a more efficient use of boars across a large number of females. However, the frequent use of semen pools from two or more boars in heterospermic inseminations can hide the suboptimal performance of some boars. The objective of this study was to compare the use of IUI against cervical AI (CAI) using heterospermic doses under routine farm conditions and also by using genetic based paternity tests to differentiate the individual contribution of each boar in both techniques. The study included 300 females from 2-5 parities submitted to CAI and IUI with doses having concentrations of 3.0×10^9 spermatozoa/85 ml and 1.5×10^9 spermatozoa /60 ml, respectively. Paternity tests were conducted using 9 microsatellites (SW24, SW951, SW857, SO386, SO101, SO090, SW240, SO155, SO355). The SW24 microsatellite was monomorphic, whereas the SO090 did not amplify. Twenty-five litters, including 300 piglets were genotyped, but paternity was excluded for only 95 piglets. Farm level comparisons showed that IUI presented inferior ($P < 0.05$) conception (90.7%) and farrowing rates (85.3%) than CAI (98.7% e 94.7%, respectively). However, total litter size did not differ ($P > 0.05$) for CAI (13.7) and for IUI (13.0). The paternity test did not allow differentiation among individual boars in the distinct insemination techniques, possibly due to the genetic similarity present in the commercial herd evaluated in this study.

Key words: intra-uterine artificial insemination, paternity test, multiplex PCR, microsatellite markers, swine.

Lista de Figuras

Pág.

FIGURA 1 - Taxas de Concepção e Parição em relação ao método de IA utilizado..	38
FIGURA 2 - Análise eletroforética do DNA genômico de leitões.....	39
FIGURA 3 - Análise eletroforética do DNA genômico dos reprodutores.....	40

Lista de Tabelas

	Pág
TABELA 1 - <i>Loci</i> utilizados em cada multiplex.....	37
TABELA 2 - Avaliação de polimorfismo existente entre os <i>loci</i> utilizados no experimento.....	41
TABELA 3 - Resultados do teste de paternidade em função do pool de sêmen avaliado, de diferentes machos e técnicas de inseminação artificial (n = 25 leitegadas).....	42
TABELA 4 - Leitões com exclusão de paternidade por macho e método de IA	42
TABELA 5 - Alelos referentes aos reprodutores utilizados na determinação da paternidade.....	43

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ácido desoxirribonucléico: DNA

Centímetro: cm

Desoxinucleotídeos trifosfatados: dNTP

Dose inseminante: DI

Fertilização *in vitro*: FIV

Horas: h

Inseminação Artificial: IA

Inseminação Artificial Intracervical: IAIC

Inseminação Artificial Intra-uterina: IAIU

Inseminação Heterospérmica: IH

Microssatélites: MS

Mililitro: ml

Milímetro: mm

Monta Natural: MN

Par de base: Pb

Relação macho: fêmea: M:F

Pequenas repetições em tandem: STR

Probabilidade de Exclusão da Paternidade: PE

Reação de Polimerase em Cadeia: PCR

Seqüência Simples repetida: SSR

SUMÁRIO

Resumo.....	6
Abstract	7
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	9
Lista de Abreviaturas e Siglas	10
Introdução Geral	13
Revisão da Literatura.....	15
Utilização de marcadores microssatélites na determinação da contribuição individual de machos suínos, para a paternidade de leitegadas produzidas por inseminação artificial intracervical e intra-uterina.....	ERRO! INDICADOR
Resumo	30
1. Introdução	31
2. Materiais e Métodos	32
2.1- Comparação entre IAIC e IAIU	32
2.1.1 - Critérios para a seleção dos pares.....	32
2.1.2 - Reprodutores utilizados	33
2.1.3 - Processamento e envasamento do sêmen.....	33
2.1.4 - Detecção de estro	33
2.1.5 - Protocolo de IA	34
2.1.6 - Diagnóstico de prenhez	34
2.1.7 - Análise estatística.....	34
2.2 - Determinação genética da paternidade.....	35
2.2.1 - Critérios para coleta de sangue dos reprodutores	35
2.2.2- Seleção das fêmeas a serem utilizadas na determinação da paternidade	35
2.2.3 - Critérios para seleção das leitegadas e coleta das caudas	35

2.2.4 - Extração do DNA das amostras coletadas.....	36
2.2.5 - Marcadores moleculares.....	36
2.2.6 - Amplificação do DNA pela PCR.....	36
2.2.7 - Quantificação do DNA total extraído.....	37
2.2.8 - Análise do produto da PCR	38
2.2.9 - Análise dos resultados de identificação de paternidade	38
3. Resultados	38
3.1- Comparação entre IAIC e IAIU	38
3.2- Determinação genética da paternidade	39
4. Discussão.....	44
5. Referências.....	48
Conclusão	50
Referências.....	51
Anexos	59
Anexo 1: Protocolo de extração de DNA de sangue fresco	59
Anexo 2: Protocolo extração e purificação do DNA da cauda dos leitões.....	61

Introdução Geral

A carne suína representa cerca de 40 % de toda carne vermelha consumida no mundo, atualmente correspondendo a uma parte significativa da dieta humana, em virtude do aumento do consumo per capita (GERRITS et al., 2005). Devido a este fato, a suinocultura moderna, teve como necessidade, se tornar cada vez mais eficiente e sustentável, fornecendo produtos de alta qualidade, a um preço competitivo, no intuito de garantir sua participação no mercado consumidor (KRUEGER & RATH, 2000). Em virtude disto, se fez necessário aumentar a produtividade, através da implementação de biotécnicas que proporcionassem tais resultados. Outro fator que possibilitou este aumento foram os recentes avanços na biotecnologia e genômica animal (GERRITS et al., 2005).

A introdução da técnica de inseminação artificial (IA) em animais domésticos ocorreu inicialmente em virtude do melhoramento genético, e por razões sanitárias (VERBERCKMOES et al., 2004). A partir disto, posteriormente, observou-se uma melhora significativa nos aspectos reprodutivo e econômico, possibilitando uma aceleração da difusão de características desejáveis de reprodutores de alto mérito genético (ZEOCHINI et al., 2004).

A IA intra-uterina foi desenvolvida recentemente como uma biotécnica com contribuição fundamental para este crescimento, em virtude de possibilitar uma maior contribuição da dose inseminante de cada reprodutor individualmente, para um número maior de fêmeas. Desta forma, seria possível um maior avanço no melhoramento genético destes animais, pois um reprodutor de alto mérito genético disseminaria suas características mais rapidamente, e em maior amplitude por sua progênie (VERBERCKMOES et al., 2004). Entretanto, apesar dos reprodutores presentes em centrais de IA apresentarem ótimo desempenho reprodutivo, existem diferenças individuais em relação à sua taxa fertilizante (MEZALIRA et al., 2003),

sendo estas diferenças, evidenciadas ao utilizarmos como base a IA homospérmica, que consiste na utilização de DI proveniente de apenas um reprodutor (BERGER & PARKER, 2005; FLINT, et al., 2003). Porém, a IA heterospérmica, prática esta muito difundida em suinocultura, se faz a partir da produção de DI com a utilização do ejaculado de 2 ou mais reprodutores; promoveria a diluição do efeito individual de cada reprodutor (DZIUK, 1996), havendo uma grande possibilidade de que o desempenho reprodutivo insuficiente de um determinado reprodutor seja compensado pelo desempenho reprodutivo de outro, cujo sêmen esteja presente na mesma dose de IA heterospérmica (STAHLBERG et al. 1998).

Portanto, a determinação genética da paternidade seria uma metodologia mais concreta para permitir a detecção dos possíveis reprodutores de baixo mérito genético, através da quantificação de sua contribuição para a formação da leitegada, possibilitando uma correta seleção destes reprodutores.

Além disso, o teste de paternidade possibilitaria a verificação de uma possível diferença de desempenho dos reprodutores em relação à técnica de IA utilizada no experimento.

Revisão da Literatura

Introdução

Segundo a FAO (2002/2004), a população mundial de suínos vem aumentando gradativamente, de 940 milhões de animais em 2002 para 960 milhões de suínos em 2004, atingindo neste ano, uma produção de 100 milhões de toneladas de carne suína. Entretanto, apesar do crescimento da população humana (1,45%) ter sido inferior ao da população de suínos (2,4%), no período de 2003 a 2004, este aumento se deu, em virtude do aumento do consumo mundial *per capita*, passou de 15,7 em 2003 para 15,9 Kg/habitante em 2004. Portanto, o desenvolvimento de novas tecnologias é fundamental para que esse incremento de produção possa ser sustentado.

O primeiro relato da utilização da técnica de inseminação artificial (IA) em suínos, foi no Japão e Rússia, por volta da década de 30. Posteriormente, a difusão da IA foi ocorrendo, de maneira gradativa, por diversos países (WENTZ & BORTOLOZZO, 1998). Entretanto, esta biotécnica somente foi introduzida no Brasil em meados da década de 70. A partir deste período, vem sendo implantada em nível comercial de maneira crescente, com o uso de técnicas mais aperfeiçoadas, na tentativa de aumentar os índices reprodutivos dos plantéis suínos, através da possibilidade de rápido melhoramento genético destes animais (SILVEIRA et al., 1980). Desde esta época, foram criadas centrais de IA, primeiramente na região sul do Brasil, em 1975, que possibilitaram a popularização desta tecnologia, permitindo então sua difusão para todas outras regiões do país (BORTOLOZZO et al., 2005).

Uma estimativa realizada recentemente pela ABIPES/ABCS (2001) mostra que o rebanho nacional de fêmeas se manteve estável nos últimos anos, totalizando aproximadamente 2,2 milhões de animais, sendo que cerca de 50% das matrizes são alojadas em granjas tecnificadas, onde se utiliza a IA, sendo estas

numericamente representadas por 1,2 a 1,3 milhões. A IA vem se constituindo numa prática indispensável à qualificação da produtividade, possibilitando melhora nos índices reprodutivos e oferecendo novas perspectivas tecnológicas à atividade. No entanto, algumas limitações devem ser consideradas para a obtenção de índices satisfatórios, como: a qualificação de pessoal; o emprego de manejo reprodutivo adequado à técnica de IA; a necessidade da proximidade a uma central de IA ou sua implantação na própria granja, devido ao curto período de conservação do sêmen (em média 72 h) (VIANA, 1998).

A ampla difusão mundial da IA está relacionada a um aumento na comercialização de sêmen pelas centrais de IA (sistemas abertos) e também pelo aumento no número de programas de produção de sêmen em ambiente de granja, nos chamados sistemas fechados (DESCHAMPS et al., 1998); e principalmente, com a redução do custo final de produção obtido com a implementação desta técnica, quando comparada à monta natural (MN) (BORTOLOZZO & WENTZ, 1997).

Atualmente, ainda é possível observar granjas menos tecnificadas utilizando a técnica de MN, que requer uma maior quantidade de machos em um plantel, em função de uma reduzida relação macho:fêmea (M:F), em torno de 1:25 (CORRÊA et al., 2001). Em consequência disto, existem maiores gastos com instalações, alimentação e medicamentos, restringindo investimentos em outros setores.

Embora a IA não seja uma tecnologia nova, vem sendo implantada na suinocultura de uma forma cada vez mais intensa (DESCHAMPS et al., 1998) e mais aperfeiçoada, na tentativa de cada vez mais superar os índices zootécnicos alcançados anteriormente. Segundo Belstra (2002), grande parte das pesquisas em relação à técnica de IA tem como principal objetivo, a redução do número de espermatozóides por dose inseminante (DI)/serviço, sem que haja comprometimento da taxa de parição e do tamanho de leitegada, o que deve, ainda, garantir a manutenção e a sustentabilidade da produção em larga escala em granjas tecnificadas. Para a obtenção de índices de desempenho satisfatórios com esta técnica, diversos fatores devem ser observados, dentre os quais o momento da realização da IA. Neste contexto, devemos nos conscientizar da existência de grande variação individual na duração de cio, momento de ovulação e presença de mão de obra qualificada.

De acordo com Corrêa et al., (2001), podemos verificar que em sistemas que usam a técnica de IA intracervical (IAIC), a relação macho:fêmea passa a ser de 1:80 à 1:200. Nestas condições, o uso de IA seria plenamente justificado, pois o número de leitões nascidos/fêmea/ano seria superior ao obtido com MN. Desta forma, a atividade se tornaria mais rentável, por possibilitar um maior investimento em outros setores da granja, assim como uma rigorosa seleção de doadores de sêmen (SILVEIRA et al., 1980). Uma vez que a produção de ejaculados de alta qualidade permite a utilização de um número relativamente pequeno de machos, a seleção destes é bastante intensa, visando a utilização somente daqueles que apresentarem melhor potencial reprodutivo (COLENBRANDER & KEMP, 1990; COLENBRANDER et al., 2001). Além disso, a utilização da IA em um maior número de fêmeas a partir de um macho, possibilita um maior avanço no melhoramento genético destes animais; tendo em vista que um reprodutor de alto potencial genético disseminaria suas características mais rapidamente, e em maior amplitude por sua progênie (VERBERCKMOES et al. 2004).

Inseminação Artificial Intracervical (IAIC)

O método de IA intracervical (IAIC) é o mais utilizado em granjas tecnificadas. Com a obtenção de um maior número de DI/macho é possível atingir, com boas condições de manejo, uma produção anual de até 2.000 DI/ano (BENNEMANN et al., 2003), o que leva a uma melhoria na eficiência reprodutiva da granja (CORRÊA et al., 2001).

A concentração utilizada para este tipo de IA foi padronizada em $2,5-3,0 \times 10^9$ espermatozóides/ml (CORRÊA et al., 2001). Esta concentração foi estipulada, tendo-se em vista que, neste tipo de IA, o sêmen é depositado no interior da cérvix, ficando grande parte do mesmo retido nas criptas cervicais. Posteriormente, as células espermáticas devem passar pela junção útero-tubárica, que consiste na primeira porção do istmo e que atua como uma barreira para o transporte das células espermáticas, mas também como um reservatório de espermatozóides, antes da ocorrência da ovulação (LANGENDIJK et al., 2002). Portanto, o restante das células deve percorrer um longo trajeto, até a ampola do oviduto, local onde ocorre a fecundação (RATH, 2002).

Além destas barreiras, outro inconveniente associado à IAIC é a ocorrência de refluxo durante e/ou logo após o término da IA. Segundo Dallanora et al. (2003), a ocorrência de maior ou menor refluxo pode ser decorrente do volume da dose inseminante, impaciência e/ou habilidade do inseminador durante o processo de IA, e de variações na contratilidade uterina.

Langendijk et al. (2005), observaram que essa atividade miometrial aumenta durante o estro, em função de diversos fatores, como: a presença do macho durante a IA e a presença de estrógenos no ejaculado, o que pode desencadear a liberação de prostaglandinas, que aumentariam esta atividade. Em contrapartida, o estímulo tátil do trato genital (cérvix), e a pressão exercida nas regiões do flanco, levam a um pequeno estímulo desta atividade.

Um experimento realizado por Steverink et al. (1998) demonstram que todas as fêmeas inseminadas apresentaram refluxo, sendo este muito variável individualmente em relação ao volume e concentração. Além disso, esta concentração, em todas as fêmeas, apresentou um decréscimo na medida em que aumentaram o número de horas após a IA. Entretanto, em suínos, a ocorrência de refluxo é um evento fisiológico, que levaria a alterações nas taxas de fertilização, somente se a DI apresentar concentração igual ou inferior a 1×10^9 espermatozoides/80 ml (STEVERINK et al., 1998). Este efeito foi comprovado por Watson & Behan (2002), que compararam 3 concentrações espermáticas de 3, 2 e 1×10^9 espermatozoides/ml, concluindo que somente a DI contendo 1×10^9 espermatozoides/ml apresentou baixo número de nascidos.

Um experimento conduzido por Bennemann et al. (2005) demonstrou que leitoas submetidas a IAIC, com uma única DI com concentração de $1,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml, armazenada por no máximo 48 h e com a IA realizada no momento de ovulação, guiada por ultra-som, não apresentaram diferenças entre o total de embriões e a sobrevivência embrionária. Entretanto, este estudo relata diferenças estatísticas, quando a IA foi realizada com somente uma DI 24-30 h após a detecção de estro, com DI armazenada por 96-120 h.

A dose inseminante (DI) pode ser utilizada:

- à fresco; após a preparação das doses inseminantes, as mesmas estão prontas para serem utilizadas, no momento seguinte (GORDON, 1999).

► resfriada:

- à temperatura de 15 -18 °C; técnica mais difundida nas centrais de IA de um modo geral, com manutenção das DI em caixas acondicionadoras por, no máximo, 72 h, ou por períodos superiores a 72 h (em torno de 120 h), em diluentes de longa duração (GERRITS et al., 2005). Este acondicionamento deve promover a manutenção da qualidade espermática, de modo que a motilidade não deva ser menor que 60 % antes da inseminação, mantendo mais de 2,5 bilhões de células vivas por dose (CORRÊA et al., 2001).

- à 5 °C; esta alternativa geraria uma diminuição de custos, levando a uma maior aplicabilidade em granjas de menor escala de produção, tendo em vista a possibilidade de armazenamento do sêmen em refrigeradores domésticos. Porém, os diluentes normalmente utilizados para acondicionar sêmen a 15-18 °C não permitem acondicionar sêmen à 5 °C (CORRÊA et al., 2001 e 2004), pelos danos sofridos pelo mesmo, principalmente em relação a motilidade, morfologia, e capacidade fecundante.

► Congelado; a técnica de cripreservação do sêmen suíno foi estabelecida por Pursel & Johnson (1975), mas não é aplicada como rotina, pelo fato que o sêmen congelado apresentar, após o descongelamento uma baixa taxa de fertilidade (cerca de 60 %), o que inviabiliza seu uso. Segundo Roca et al. (2003), o uso de sêmen congelado nos programas de IA comercial (IAC), é ainda muito limitado, devido a baixas taxas de concepção em relação ao sêmen resfriado (cerca de 20 % a menos). Entretanto, Roca et al. (2002), não observaram diferenças na taxa de concepção e no tamanho de leitegada utilizando IA intra-uterina (IAIU), comparando sêmen resfriado e congelado. Estes achados indicam que a IAIU terá papel importante para viabilizar futuramente o uso de sêmen congelado em suínos em nível comercial (RATH, 2002). Entretanto, Saraiva et al. (2005), observaram uma maior viabilidade de espermatozóides após o descongelamento de DI com concentração de 2×10^9 espermatozóides/0,7 ml, quando comparada à mesma concentração da DI envasada em palhetas de 0,5 ml, possibilitando seu uso na técnica de IAIU por necessitar de menor volume de DI.

Inseminação Intra-uterina (IAIU)

O primeiro relato da realização da técnica de IAIU em fêmeas suínas foi feito por Hancock em 1959 (BORTOLOZZO et al., 2005), utilizando uma DI de $0,1 \times 10^9$ a 10×10^9 espermatozóides, com as concentrações diluídas de 20 e 120 ml. Estes autores observaram que a fertilidade das fêmeas foi melhor ao utilizarem a DI somente com 20 ml. Para a realização desta técnica, foram desenvolvidos catéteres flexíveis, de 3-5 mm de diâmetro, que são introduzidos no interior da pipeta de IAIC (8 mm de diâmetro), a qual já se encontra fixada na cérvix, estendendo-se cerca de 20 cm além da pipeta convencional. Portanto, a DI é depositada no corpo do útero das fêmeas (WATSON & BEHAN, 2002). Em contrapartida, foram também desenvolvidos catéteres que não utilizam a pipeta de IAIC como guia. Em seu experimento, Watson & Behan (2002) verificaram que 95% das fêmeas inseminadas não apresentaram nenhum tipo de resistência durante a introdução do catéter, sendo que as 5% restantes apresentaram uma leve resistência durante sua passagem através da cérvix. Portanto, é necessário realizar uma leve pressão para que o catéter atinja o útero, reduzindo a ocorrência de lesões.

A utilização da IAIU não é recomendada em leitoas e primíparas, pois estas fêmeas não apresentam seu trato reprodutivo totalmente desenvolvido, possuindo a cérvix mais estreita, o que pode ser associado com a ocorrência de lesões, culminando num fim precoce de sua vida reprodutiva (WATSON & BEHAN, 2002). Assim, estas categorias de fêmeas, em geral, não foram avaliadas em muitos dos experimentos conduzidos com IAIU (WATSON & BEHAN, 2002; ROBERTS & BILKEI, 2005; DALLANORA et al., 2004). Entretanto, Serret et al. (2006), utilizaram fêmeas primíparas em um experimento de campo, observando efeitos negativos sobre o tamanho total da leitegada com IAIU com concentrações de 2,0, 1,0 e 0,5 espermatozóides/ml, e também efeito significativo da interação entre ordem de parto e concentração sobre a taxa de parição, também com alguns efeitos negativos sobre o desempenho das fêmeas primíparas.

Na IAIU, há um número menor de barreiras mecânicas (cérvix) e fisiológicas a serem vencidas pelos espermatozóides no seu trajeto, até o local de fertilização. Desta forma, a duração do trajeto a ser percorrido até o oviduto se torna menor, o que pode se refletir na obtenção de índices satisfatórios de desempenho reprodutivo com menores concentrações espermáticas (WATSON & BEHAN 2002). Em virtude disso, o ejaculado de um determinado macho pode ser utilizado em um maior

número de DI, atingindo relações macho:fêmea de 1:300 a 1:2000 (VÁZQUES et al., 2003; WATSON & BEHAN, 2002).

Segundo Dallanora et al. (2003), a deposição do sêmen no útero facilita sua rápida progressão, permitindo maior retenção dos espermatozóides no trato genital, mesmo com grande volume de refluxo. Neste experimento, não foram observadas diferenças na proporção de espermatozóides refluídos nas doses de 1×10^9 espermatozóides e de $0,025 \times 10^9$ espermatozóides, mas a quantidade de sêmen que permaneceu no trato reprodutivo da fêmea foi quatro vezes superior com a dose mais elevada. Portanto, este valor seria relevante com relação ao número de embriões produzidos, caso fosse realizada uma única IA por fêmea.

Watson & Behan (2002), compararam na técnica de IAIU, 3 diferentes concentrações ($3,0$, $2,0$ e 1×10^9 espermatozóides/ml), não observando diferenças em taxas de parição e total de leitões nascidos entre estas concentrações. Este resultado permitiu a confirmação de que a IAIU com 1×10^9 espermatozóides / ml é uma técnica simples, efetiva, segura de se realizar e que permite alcançar resultados semelhantes, quando comparado à 3 e 2 bilhões na IAIC, não afetando o total de leitões nascidos. Entretanto, DI com concentração de $0,5 \times 10^9$ espermatozóides podem apresentar resultados variáveis. Alguns trabalhos descrevem taxas de parição e tamanho de leitegada reduzidos com DI com esta concentração (ROZEBOOM et al., 2004; SERRET et al., 2006; DALLANORA et al., 2003), enquanto outros relatam resultados satisfatórios em relação a taxa de prenhez e sobrevivência embrionária (MEZALIRA et al., 2003).

Dallanora et al. (2004), utilizando 3×10^9 espermatozóides/90 ml na IAIC e $1,5 \times 10^9$ espermatozóides/60 ml na IAIU não observaram diferenças nas taxas de concepção e parição, bem como no tamanho total de leitegada. Resultados similares quanto à taxa de parição foram relatados por Roberts & Bilkei (2005), ao compararem DI com concentrações de 3×10^9 espermatozóides na IAIC e 1×10^9 espermatozóides na IAIU, mas estes autores relatam redução no tamanho de leitegada com IAIU.

A utilização de sêmen congelado/descongelado na IAIU se torna possível, devido ao fato da deposição espermática ser em posição mais vantajosa para sua progressão. Este fato foi comprovado por Roca et al. (2002), que obtiveram taxa de parição e total de leitões nascidos com sêmen congelado/descongelado em níveis semelhantes aos obtidos com na IAIC com sêmen resfriado.

Em virtude da possibilidade de diminuição da DI utilizada na técnica de IAIU, os reprodutores suínos passariam a ter um papel ainda mais importante no desempenho reprodutivo do plantel, pois fertilizariam em um número maior de fêmeas. Assim, estes machos deveriam ser selecionados através de métodos mais seletivos para a estimativa de sua fertilidade, baseados em técnicas *in vitro*, (VERBERCKMOES et al., 2004; MACEDO et al., 2006).

Através de fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos de hamsters, Berger & Parker (1988) ao comparar nove reprodutores suínos, observaram que dois destes apresentaram infertilidade, caracterizada por taxa de concepção nula, devido à inabilidade de seus espermatozóides penetrarem oócitos *in vitro*. Porém, estes machos apresentaram motilidade e vigor normais, em avaliações convencionais de qualidade de sêmen. Resultados semelhantes foram observados quando vários métodos convencionais foram comparados à taxa de penetração espermática *in vitro* (MACEDO et al., 2006).

A seleção de reprodutores para centrais de IA, em geral, é baseada dentro de seu potencial genético para transmitir à progênie características de desempenho de interesse econômico (ROBINSON & BUHR, 2005). Entretanto, mesmo com ótimo desempenho reprodutivo, estes reprodutores apresentam diferenças em desempenho de natureza individual, que se refletem nas taxas de fertilização (MEZALIRA et al., 2003). Estes autores, ao utilizarem 4 reprodutores de alto mérito genético em IAIU com concentrações espermáticas distintas ($1,0$, $0,5$ e $0,25 \times 10^9$ espermatozóides/dose), observaram que, em todas as concentrações, as taxas de prenhez superiores foram obtidas sempre com um mesmo macho, enquanto que um outro apresentou sensível redução em sua taxa de prenhez, na concentração de $0,25 \times 10^9$ espermatozóides/dose. Estes achados foram confirmados em outros trabalhos que utilizaram vários métodos distintos na estimativa do potencial fertilizante de reprodutores suínos (VESSEUR et al., 1996; POPWELL & FLOWERS, 2004). Assim, uma grande redução na concentração da DI utilizada, em machos com diferenças sutis em termos de fertilidade, pode acarretar na exacerbação destas diferenças, quando estes machos forem utilizados em IA homospermica (FLINT et al., 2003; MEZALIRA et al., 2003), especialmente porque a capacidade fertilizante destes machos pode ser mascarada quando estimada por técnicas convencionais (STAHLBERG et al., 1998).

Desta forma, o impacto destas diferenças individuais pode ser minimizado através do uso de *pools* de sêmen de diferentes machos na mesma DI, na chamada IA heterospermica (IH) (DZIUK, 1996). A IH com número igual de espermatozóide de dois ou mais reprodutores possibilita uma maior segurança na avaliação de diferenças existentes em cada macho (STAHLBERG et al., 1998). Em touros, estimou-se que a IH pode ser cerca de 170 vezes mais eficiente na determinação da fertilidade de diferentes machos quando comparada à IA homospermica (FLINT et al., 2003). A maior eficiência da IH, em comparação com a IA homospermica também foi relatada em aves e suínos (MARTIN & DZIUK, 1977), com os índices de desempenho seguindo uma determinada hierarquia em relação ao macho mais fértil. Davis et al. (2005) utilizando oócitos de hamsters e IA homospermica e heterospermica, relatam que a taxa de penetração oocitária foi altamente correlacionada com a fertilidade dos machos, quando utilizada a IH. Assim, as taxas de penetração oocitária com IH seriam indicadores de fertilidade mais precisos, quando comparados com IA homospermica.

O estabelecimento de uma hierarquia de fertilidade entre diferentes machos, mesmo quando comparados através de sofisticadas técnicas *in vitro*, indica que métodos ainda mais precisos são necessários para discriminar diferentes capacidades fertilizantes. Neste contexto, testes genéticos de determinação de paternidade seriam alternativas de maior precisão, mas exigiriam alta confiabilidade na origem dos *pools* de sêmen utilizados como DI (STAHLBERG et al., 2000).

Determinação genética da Paternidade

Programas de melhoramento genético são baseados na transmissão dos genes desejados, desde os progenitores até sua progênie, o que torna necessário lançar mão de métodos que possam confirmar a paternidade dos indivíduos, ou seja, garantindo as informações presentes nos seus respectivos *Pedigrees* (OLIVEIRA & KUABARA, 1999). Com o surgimento das diversas Associações de Criadores, foi criado o Registro Genealógico, no intuito de garantir a pureza e a descendência correta das raças cruzadas (TOZAKI et al., 2001).

Segundo Oliveira & Kuabara (1999), o método de tipagem sanguínea, descoberto em 1938, na Universidade de Wisconsin-Madison (EUA), foi o primeiro teste desenvolvido para a verificação de parentesco. Este teste permaneceu como o

método de eleição para a determinação da paternidade durante muitas décadas (BOWLING et al., 1997). Recentemente, com o avanço das pesquisas em biotecnologia, foi desenvolvido o método de tipagem por DNA, como uma alternativa mais precisa para este tipo de diagnóstico (GRATTAPAGLIA, 2004).

Na espécie suína, poucos são os experimentos que envolvem a identificação da paternidade. Isto também se aplica em nível comercial, em virtude do valor individual do suíno não ser extremamente alto, uma vez que o melhoramento genético nesta espécie é trabalhado em termos populacionais. Por outro lado, nas espécies eqüina e bovina, os indivíduos possuem alto valor comercial. Portanto, testes de paternidades se tornam importantes, para garantir a determinação precisa da ascendência, evitando possíveis fraudes. Por este motivo, que a identificação da paternidade se tornou de caráter obrigatório, no Brasil, para eqüinos e bovinos, para permitir os registros nas Associações de Criadores (TOZAKI et al., 2001; CURI & LOPES, 2002). Além disso, a tipagem sanguínea somente é normatizada pelo Ministério da Agricultura, no Brasil, para as espécies referidas acima, sendo exigida para registro de reprodutores, doadoras de embriões e produtos de transferência de embriões (SOCIEDADE RURAL, 2005).

Uma outra maneira de determinação da paternidade, muito utilizada anteriormente, em animais domésticos, é através da observação das características fenotípicas apresentadas pelos descendentes (STAHLBERG et al., 2000). Porém, este é um método de baixa confiabilidade, em virtude de se tratar de uma avaliação visual, na qual são observadas, apenas, características semelhantes dos pais esperadas na progênie, como coloração de pêlo e conformação estrutural (AZMAL et al., 2004); e somente possível de ser realizado, se utilizadas linhagens e/ou raças com fenótipos distintos. Porém, apesar de sua baixa acurácia, a observação das características fenotípicas pode ser utilizada na determinação da paternidade de leitegadas suínas, ao nascer (VESSEUR et al., 1996). Estes autores usaram, como base, dois machos de raças distintas (Great Yorkshire-GY e Meishan-MEI), dos quais foram coletados ejaculados, para posterior uso em IA homospérmica, havendo somente variação na ordem da DI de cada macho. Como resultado, foi observado que 40% das leitegadas foram originadas de ambas IA, porém a técnica utilizada nessa determinação foi extremamente subjetiva. Entretanto, uma maior ou menor contribuição para a formação da leitegada se deu, por efeitos individuais, tanto das fêmeas (intervalo-desmame-estro, taxa de parição), quanto dos machos utilizados.

Apesar do método de tipagem sanguínea ser um método ainda hoje muito utilizado para determinação da paternidade, em virtude de seu baixo custo, este possui probabilidade de exclusão (PE) da paternidade de 90-97% (BOWLING, 1985; apud. TOZAKI, 2001; BOWLING, 1997). Recentemente, os integrantes do *International Stud Book Comittee* (ISBC), determinaram, em uma conferência, a necessidade de aumentar o valor desta PE (TOZAKI et al., 2001). A partir dessa determinação, a técnica de tipagem por DNA, deverá gradativamente substituir a tipagem sanguínea, em virtude de possuir uma PE que pode atingir até 100%, levando a uma maior precisão nos resultados.

Bowling et al. (1997) atingiram PE de 98,3%, utilizando 11 marcadores microssatélites em equinos. Entretanto, PE de 99,97%, foi obtida por Van Dongen & Mulder (2005), utilizando 6 marcadores moleculares, em aves. A partir destes resultados, é possível concluir que, apesar da acurácia da tipagem por DNA ser maior, quando comparado a outras técnicas, não se deve considerar a tipagem de DNA como infalível como muitos inicialmente acreditavam ser (PENACINO et al., 2003). Além disso, os resultados, de um modo geral, são extremamente variáveis, de acordo com a espécie e marcadores utilizados (RON et al., 1996; MOMMENS et al., 1998; CURI & LOPES, 2002; VAN DONGEN & MULDER, 2005).

Estas falhas na identificação da paternidade foram comprovadas por Bowling et al. (1997), ao utilizarem 15 *loci* de grupos sanguíneos (tipagem sanguínea), comparadas à utilização de 11 *loci* de microssatélites com repetições em *tandem* dinucleotídicas (tipagem por DNA). Estes autores observaram que os 26 *loci* forneceram, com eficácia, uma detecção incorreta da paternidade de 99,999%, comprovando que dificilmente este resultado seria detectado. Além disso, apesar dos poucos microssatélites utilizados no experimento, a tipagem por DNA se mostrou mais eficaz que a tipagem sanguínea, por apresentar maior grau de polimorfismo, possibilitando a detecção de incompatibilidade genética, evitando assim, a ocorrência de determinação de falso parentesco.

Na década de 60, houve a descoberta dos marcadores fenotípicos ou morfológicos, e desde então, estes foram amplamente utilizados. Posteriormente, foram descobertos os marcadores bioquímicos (proteínas e isoenzimas), os quais substituíram os marcadores anteriores, sendo também muito utilizados.

Entretanto, na década de 80, a técnica de tipagem por DNA foi iniciada, através da descoberta de regiões hipervariáveis, inicialmente no DNA humano,

sendo este, um dos marcos iniciais para o direcionamento da pesquisa de novas ferramentas moleculares para aplicação, tanto em medicina humana, quanto em agropecuária (SCANDURA, 2004).

Como as duas primeiras categorias de marcadores (morfológicos e bioquímicos) possuíam alto custo e não forneciam resultados conclusivos, testes de paternidade ficaram, por algum tempo, limitados (CURI & LOPES, 2002). Porém, o alto grau de variabilidade e de detecção de polimorfismos presentes no DNA de diversas espécies, característicos dos marcadores moleculares, permitiu a obtenção de maior acurácia, eliminando tais limitações pré-existent (SCANDURA, 2004). Esses marcadores consistem de todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (no caso de isoenzimas) ou de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) por Mullis em 1983 (REGITANO & COUTINHO, 2001; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; ZAHA et al., 2003), houve um grande impulso no desenvolvimento e utilização de diversos tipos de marcadores moleculares, para os mais variados tipos de diagnósticos. A PCR consiste na amplificação *in vitro* de segmentos específicos do DNA genômico, obtido após sua extração. Porém, para sua realização, é necessário a incorporação à reação de: enzima DNA Polimerase; desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP); e oligonucleotídeos sintéticos, denominados “iniciadores” ou *primers* complementares às regiões do DNA que se deseja amplificar. Estes *primers* possibilitam, no final da PCR, a obtenção de milhares de cópias dos segmentos de DNA em questão (REGITANO & COUTINHO, 2001), pelo fato de que a cada ciclo da PCR, a quantidade de DNA amplificado dobra, seguindo uma progressão geométrica, a qual fornecerá ao final de 20 ciclos, mais de um milhão de fragmentos amplificados (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Esta técnica envolve 3 etapas distintas: (1) a etapa de desnaturação da molécula de DNA alvo, pelo aumento da temperatura para 92°C; (2) o anelamento dos *primers* pela redução da temperatura para 45-65°C, o que permite a formação das pontes de hidrogênio entre cada par de *primer* e a fita molde; e (3) a etapa de extensão, que consiste na polimerização da cadeia de DNA, através da adição feita pela DNA polimerase, dos respectivos nucleotídeos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; REGITANO & COUTINHO, 2001).

As técnicas que utilizam marcadores moleculares permitem a detecção de variações e/ou polimorfismos existentes entre indivíduos, em determinadas populações em regiões específicas do DNA. Estes polimorfismos podem ser utilizados no intuito de construção de mapas genéticos e, também, para detectar diferenças entre os marcadores, na expressão de características em uma determinada família, em caso de determinação de paternidade (MONTALDO & MEZA-HERRERA, 1998). Apesar dos marcadores moleculares, de uma maneira geral, apresentarem um alto grau de polimorfismo (CURI & LOPES, 2002), os marcadores microssatélites, são tidos como os ideais para determinação da paternidade em diversas espécies (DAWID et al., 2003), como: cães (ICHIKAWA et al., 2001); bovinos (CURI & LOPES, 2002); búfalos (MOMMENS et al., 1998); suínos (NECHTELBERGER et al., 2001; PUTNOVÁ et al., 2003; LI et al., 2004; FANG et al., 2005; SCHWARZ et al., 2005) eqüinos (BOWLING et al., 1997; TOZAKI et al., 2001); e chimpanzés (VIGILANT et al., 2001). Isto ocorre, porque esses marcadores possuem maior grau de polimorfismo, sendo de fácil genotipagem, e distribuídos de forma abundante no genoma de mamíferos, quando comparados aos demais marcadores (LITT & LUTY, 1989; apud Rohrer et al., 1997).

Cesconeto et al. (2003), utilizaram 5 marcadores microssatélites (S0082, S0097, IGF-I, TNFm1 e TNFm2), os quais haviam sido utilizados com sucesso por Stahlberg et al. (2000), para a determinação da paternidade em suínos. Porém, somente 2 (S0082, S0097) dos 5 marcadores apresentaram resultados que permitissem a determinação da paternidade, sendo que para os 3 microssatélites restantes, não houve amplificação suficiente para possibilitar tal identificação. Estes microssatélites, nada mais são que seqüências simples repetidas (SSR - *Simple Sequence Repeats*), ou também denominados, pequenas repetições em *tandem* (STR - *Short tandem Repeats*), de mono, di, tri ou tetra nucleotídeo (BOWLING et al., 1997; REGITANO & COUTINHO, 2001), presentes em grande quantidade e distribuídas ao longo do genoma de eucariotos. Estes marcadores, denominados locus-específicos (OLIVEIRA & KUABARA, 1999), são tidos como mais polimórficos que os locos hipervariáveis (minissatélites) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998), comprovando sua melhor atuação e confiabilidade, na determinação da paternidade. Ainda, os marcadores microssatélites possuem como elementos repetidos mais freqüentes, em mamíferos, as extensões dinucleotídicas, poli CA e GT (HAMADA et

al., 1982, apud, FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; REGITANO & COUTINHO, 2001), apresentando, geralmente, repetições menores que 100 pares de bases (pb) (TAUTZ, 1989, apud. REGITANO & COUTINHO, 2001).

Entretanto, pelo fato de que estas repetições em *tandem* serem freqüentemente dinucleotídicas, esta classe de marcadores apresenta uma alta probabilidade de ocorrência de mutações (DAWID et al., 2003), através da inclusão ou exclusão de 1 ou mais nucleotídeos ou repetições di nucleotídicas no genoma dos descendentes diretos, levando a uma diferença numérica no resultado dos alelos, acarretando em uma possível falsa exclusão da paternidade de seu respectivo progenitor (XU et al., 2000). A partir do exposto, seria interessante que a técnica de determinação da paternidade fosse utilizada como uma ferramenta de detecção dos machos que possivelmente não possuam as características reprodutivas necessárias para serem selecionados como reprodutores e que, devido á ineficiência dos métodos convencionais de estimativa de fertilidade, poderiam produzir índices insatisfatórios de desempenho e prejuízos econômicos. Esta situação seria favorecida pela freqüente utilização de *pools* de sêmen na espécie suína, o que pode fazer com que reprodutores de menor fertilidade tenham seu desempenho favorecido pela mistura de seu sêmen com o de outros machos de fertilidade superior. Estas discrepâncias poderiam ser reduzidas com o uso do teste de paternidade, para diferenciar o potencial fertilizante dos machos incluídos em cada *pool*.

Determinação da paternidade de leitegadas suínas por marcadores microssatélites utilizando inseminação heterospérmica, com deposição espermática intracervical e intrauterina, para a verificação da contribuição individual de machos suínos.

(Trabalho nas normas da revista Theriogenology)

Determinação da paternidade de leitegadas suínas por marcadores microssatélites utilizando inseminação heterospérmica, com deposição espermática intracervical e intrauterina, para a verificação da contribuição individual de machos suínos.

Andrea Panzardi ¹, Carine Dahl Corcini ¹, Elisângela Mirapalheta Madeira ¹, Lúgia Maria Piassi ¹, Odirlei Calderam ³, Roberta Mattos Colares Bressel ², Luciano da Silva Pinto ², João Carlos Deschamps ¹, Thomaz Lucia Jr. ¹

1. PIGPEL, Centro de Biotecnologia, Faculdade de Veterinária

2. Laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal, Centro de Biotecnologia

3. Doux Frangosul Ltda.

Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

apanzardi@uol.com.br

Resumo

A possibilidade de redução no volume e concentração da dose inseminante (DI) na inseminação intra-uterina (IAIU) permite um melhor aproveitamento do reprodutor suíno em um maior número de fêmeas. Porém, o uso freqüente de *pools* de 2 ou mais machos na inseminação heterospérmica pode mascarar o baixo desempenho de alguns reprodutores. O objetivo deste estudo foi comparar o uso de IAIU com a inseminação artificial intracervical (IAIC), em condições de rotina de granja, através da determinação genética da paternidade em amostras heterospérmicas de sêmen, para identificar o desempenho reprodutivo individual de reprodutores suínos. Foram utilizadas 300 fêmeas de ordem de parto (OP) 2-5, submetidas a IAIC e IAIU, com doses inseminantes com concentração de $3,0 \times 10^9$ espermatozóides/85 ml e $1,5 \times 10^9$ espermatozóides/60 ml, respectivamente. Para o teste de paternidade foram utilizados 9 microssatélites (SW24, SW951, SW857, SO386, SO101, SO090, SW240, SO155, SO355). O SW24 apresentou-se monomórfico e o SO090 não apresentou amplificação alguma. Foram genotipadas 25 leitegadas, totalizando 300 leitões, havendo exclusão de paternidade somente em 95 leitões. O teste de campo evidenciou desvantagem da IAIU ($P < 0,05$), em termos de taxa de concepção (90,7%) e parição (85,3%), em comparação com a IAIC (98,7% e 94,7%,

respectivamente). Porém, o tamanho total da leitegada para IAIC (13,7) e IAIU (13,0) não diferiu ($P > 0,05$). A exclusão de paternidade não permitiu diferenciação entre os machos, dentro das técnicas de IA, possivelmente em função da similaridade genética observada no plantel comercial avaliado.

Palavras chaves: inseminação artificial intra-uterina, teste de paternidade, PCR multiplex, marcadores microssatélites, suínos.

1. Introdução

Durante as últimas décadas, a utilização da técnica de IA, tem possibilitado um avanço tecnológico, tanto em âmbito sanitário, quanto reprodutivo. Isso permitiu direta e indiretamente, uma rápida expansão, em nível mundial, da atividade em suinocultura, tendo em vista que, em cerca de 50 % das matrizes alojadas em granjas tecnificadas, são utilizadas a técnica de IA, sendo o plantel atualmente estimado, no Brasil, num total de 2,2 milhões de animais [1].

Isto se tornou possível, em virtude de que grande parte das pesquisas relacionadas à reprodução de suínos, foram focadas no intuito de reduzirmos o número necessário de espermatozóides necessários por dose inseminante (DI), sem que houvesse um comprometimento na taxa de parição e tamanho de leitegada [2]. A partir disto, foi desenvolvida a técnica de IAIU, que possibilitou a utilização de menor volume e concentração de espermatozóides por DI, sem alteração dos índices citados acima [3;4]. Entretanto, [5] observaram resultados inferiores em relação às taxas de parição e tamanho de leitegada, somente ao utilizar DI com concentração de $0,5 \times 10^9$ espermatozóides. Devido à possibilidade de redução do volume e concentração da DI, o macho suíno passou a ter uma maior importância, e, também, pelo fato de aumentar a disseminação de suas características genéticas para um maior número de progênie [6].

Entretanto, existem diferenças individuais de fertilidade entre reprodutores [7], em relação ao tamanho de leitegada número de leitões nascidos vivos, e natimortos; mesmo que todos os machos tenham sido aprovados em testes de qualidade espermática para o processamento e utilização da DI [8;9]. Com o uso da inseminação heterospérmica (IH) / *pool*, realizado entre 2 ou mais machos [10], estas diferenças se diluem, impedindo a distinção das características reprodutivas individuais [11].

Portanto, para podermos detectar reprodutores de baixo mérito genético, presentes em centrais de IA, se torna necessário a utilização de métodos mais eficazes de diagnóstico destes reprodutores. O objetivo deste trabalho consiste na comparação entre as técnicas de IAIC e IAIU, com uso de doses heterospérmicas, em condições de rotina de granja, com posterior determinação genética da paternidade atribuída a cada macho, para a formação das leitegadas.

2. Materiais e Métodos

2.1- Comparação entre IAIC e IAIU

Esta etapa foi realizada em uma granja comercial, com plantel de 1.080 matrizes, em sistema de Unidade Produtora de Leitões (UPL), localizada na região do Vale dos Vinhedos, no estado do Rio Grande do Sul durante o período de novembro de 2004 a fevereiro de 2005. Foram utilizadas 300 fêmeas da linhagem Naïma, genética Penarlan[®], de ordem de parto (OP) 2-5, subdivididas em 2 tratamentos, em relação à técnica de IA aplicada: 150 fêmeas por IAIC com dose de 3×10^9 espermatozóides e volume de 85 ml; e 150 fêmeas por IAIU, com dose de $1,5 \times 10^9$ espermatozóides e volume de 60 ml.

2.1.1 - Critérios para a seleção dos pares

Após o desmame, em média aos 21 dias, as fêmeas eram alojadas em gaiolas no setor de gestação, destinadas somente para as fêmeas desmamadas permanecerem durante o período de detecção de estro e IA. Após o alojamento destas, pares de fêmeas eram formados aleatoriamente, de acordo com protocolo já pré-estabelecido, em que, cada par de fêmeas deveria apresentar: mesma ordem de parto (OP); mesmo escore corporal; dias de lactação do parto anterior igual ou menor de 2 dias; intervalo desmame-estro (IDE) igual ou menor de 2 dias; média de nascidos totais do parto anterior, divididas em 3 grupos: 9-11 leitões; 11-14 leitões; e mais de 14 leitões. Para as fêmeas que não formaram par com o lote de desmame, a IA foi realizada em um dos tratamentos (IAIC ou IAIU) e, no período de no máximo 3 semanas, era tentado alocar esta fêmea com outro par. Caso contrário àquela fêmea já inseminada era automaticamente excluída do experimento.

2.1.2 - Reprodutores utilizados

Como doadores de sêmen, foram utilizados 8 machos híbridos da genética Penarlan[®], de comprovada fertilidade, pertencentes à Unidade de Produção de Sêmen (UPS) da empresa dona da granja onde foi realizado o experimento.

Cada macho era identificado por número específico (34P, 38P, 41P, 44P, 46P, 92P, 53P, 78P), para identificar as DI(s) no momento de distribuição para as granjas. Foram formados, ao acaso, pares variáveis (*pools*), obtendo-se as DI(s) a serem utilizadas no experimento.

2.1.3 - Processamento e envasamento do sêmen

A coleta de sêmen foi realizada pelo método da mão enluvada, sendo o ejaculado imediatamente entregue pelos funcionários para a veterinária responsável pela UPS, a qual realizou todos procedimentos necessários para permitir o envase da dose.

As análises de motilidade e vigor foram realizadas por meio de microscópio óptico, e o cálculo da concentração realizado por meio de espectrofotômetro Accucell photometer[®] (IMV Technologies). As doses somente foram utilizadas se apresentassem motilidade superior a 80%.

Após estas análises, os ejaculados foram misturados em *pools* de 2 machos, sendo posteriormente diluídos no diluente X-Cell[®] (IMV Technologies), de longa duração, e então envasados em Goldenbag[™] (IMV Technologies), denominados "*blisters*".

As doses foram envasadas em envasador automático, Automatic Cochette Machine[®] (IMV Technologies), em diferentes concentrações, de acordo com a técnica, sendo que para a IAIC utilizou-se uma concentração de 3×10^9 espermatozóides / dose, com volume de 85 ml, e para a IAIU, concentração de $1,5 \times 10^9$ espermatozóides / dose, com volume de 60 ml.

2.1.4 - Detecção de estro

A detecção de estro foi realizada duas vezes ao dia, sendo a primeira, realizada na parte da manhã (8:00 h), após o arraçoamento, e a segunda realizada no período da tarde (16:30 h).

Em todo o decorrer do experimento, a técnica utilizada para detecção de estro foi a da observação do reflexo de tolerância ao homem na presença de um

macho sexualmente maduro (RTHM). Em ambos os períodos, para a realização desta detecção, foi utilizado um rufião, para estimular as fêmeas a apresentarem sinais de estro.

2.1.5 - Protocolo de IA

O experimento seguiu o protocolo de IA realizado normalmente na granja. As fêmeas submetidas a IAIC, foram inseminadas 0-24-36 h após a detecção de estro, enquanto as fêmeas submetidas a IAIU, foram inseminadas 12-24-36 h após a detecção do cio. Após a realização de todas as IA, as fêmeas foram conduzidas para outro galpão de gestação, onde permaneceram em gaiolas individuais até os 110 dias de gestação.

As inseminações foram realizadas com pipetas descartáveis em ambas as técnicas, sendo que na técnica de IAIC, foi utilizada a pipeta Goldenpig® (IMV Technologies). Já na técnica de IAIU, foi utilizada a pipeta DeepGoldenping® concept (IMV Technologies), que consiste na pipeta de IAIC, utilizada como guia, e um cateter de diâmetro em torno de 4 mm, o qual é introduzido no interior da pipeta guia (8 mm de diâmetro), progredindo cerca de 20 cm a mais do que a pipeta convencional, ultrapassando a cérvix e atingindo a região do corpo do útero, onde o sêmen é depositado.

2.1.6 - Diagnóstico de prenhez

O diagnóstico de prenhez foi realizado aos 21 dias pós-cobertura, através de ultra-sonografia transcutânea em tempo real, com transdutor setorial de 5 MHz (Tringa 50S). A confirmação de prenhez foi realizada aos 35 dias de gestação, para eliminar a possibilidade de ocorrência de reabsorção das vesículas embrionárias.

2.1.7 - Análise estatística

Foram calculadas as taxas de concepção (não retorno ao estro) e parição, segundo [12]. Informações sobre o tamanho total da leitegada foram extraídos do banco de dados da granja. As taxas de concepção e parição foram comparadas entre as técnicas através do teste de qui-quadrado. O tamanho da leitegada entre os tratamentos foi comparado por análise de variância, com comparação de médias pelo método LSD. Todas as análises foram feitas no software Statistix® [13]. O efeito

da ordem de parto (OP) das fêmeas foi incluído na comparação de ambas as variáveis.

2.2 - Determinação genética da Paternidade

Esta técnica foi realizada no Laboratório de Biotécnicas Reprodutivas, do Centro de Biotecnologia (Cenbiot), na Universidade Federal de Pelotas-UFPeL.

Para a determinação da paternidade, foram coletadas amostras de sangue dos machos envolvidos no experimento, e foram coletadas caudas dos leitões que pertenciam às leitegadas geradas pelas IA do experimento de campo.

2.2.1 - Critérios para coleta de sangue dos reprodutores

Foram coletados 10 ml de sangue de cada reprodutor, por punção da veia jugular, utilizando-se 2 tubos *Vacutainers* de 5 ml, cada um contendo EDTA potássico (50 µl -K₃ a 15), para cada reprodutor, para prevenir a coagulação do sangue. Depois de coletado, o sangue foi acondicionado imediatamente em isopor com gelo, e devidamente embalado para ser transportado.

2.2.2- Seleção das fêmeas a serem utilizadas na determinação da paternidade

Foram utilizadas um total de 25 fêmeas, sendo estas selecionadas somente se inseminadas com o mesmo *pool* de sêmen, em todas as DI(s). Deste total, 10 fêmeas foram inseminadas com IAIC, e as 15 restantes com a técnica de IAIU. Estas fêmeas foram selecionadas por terem todas as informações referentes ao total de nascidos consistentes com as informações obtidas do banco de dados e nenhuma cauda de leitão ou com identificação duvidosa.

2.2.3 - Critérios para seleção das leitegadas e coleta das caudas

A coleta da cauda dos leitões foi realizada somente nas fêmeas utilizadas no experimento e que receberam todas DI(s) referentes ao mesmo *pool* dos machos utilizados no experimento.

O procedimento para a coleta das caudas foi realizado logo após o nascimento de cada leitegada, sendo este feito através do manejo da amputação de

2/3 da cauda com alicate elétrico, o qual simultaneamente cauterizava a pele do 1/3 restante, evitando assim perdas excessivas de sangue.

Depois de amputada, a cauda foi imediatamente acondicionada em bisnagas plásticas de 100 ml para IA de suínos, contendo 25 ml de álcool 70 %, corretamente identificadas com o número da respectiva fêmea, e posteriormente, armazenadas em refrigeradores domésticos (5 °C).

Para transportá-las até o laboratório, as caudas foram devidamente acondicionadas em caixas de isopor com gelo. No laboratório, estas foram separadas por leitegadas, e então, armazenadas em câmara fria a 5 °C.

2.2.4 - Extração do DNA das amostras coletadas

A extração do DNA do sangue dos machos foi realizada segundo modificação do protocolo de extração proposto por [14] (anexo 1). A extração do DNA da cauda dos leitões foi realizada a partir de modificação do protocolo por [15] e [16] (anexo 2). Depois de extraídos os DNA, os mesmos foram armazenados a -20 °C.

2.2.5 - Marcadores moleculares

Para a determinação genética da paternidade, foram utilizados 9 marcadores microssatélites, indicados pelo International Society for Animal Genetics (ISAG), os quais foram descritos por [17] e [18]. Estes autores obtiveram sucesso em trabalhos de controle de parentesco em suínos, na Áustria e na República Tcheca, respectivamente.

Os marcadores utilizados foram: SO090, SO101, SO155, SO355, SO386, SW24, SW240, SW857 e SW951, sendo que o *primer Forward* de cada marcador foi conjugado a um dos dois tipos de sondas fluorescentes, de acordo com o tamanho de seu fragmento, no intuito de possibilitar a genotipagem do produto da PCR.

2.2.6 - Amplificação do DNA pela PCR

Para a realização da PCR foram formados dois multiplex(s) a partir dos marcadores selecionados, sendo estes distribuídos de acordo com o tamanho dos fragmentos esperados (Tabela 1).

Tabela 1: *Loci* utilizados em cada multiplex.

Locus	Multiplex / coloração	Local do cromossomo	Tamanho do fragmento
SW24	1º Multiplex	17	92 - 112
SW951	FAM	10q	124 - 136
SW857		14	145 - 159
SO386		11q	164 - 182
SO101		7q	196 - 224
SO090		12q	243 - 253
SW240	2º Multiplex	2q	94 - 114
SO155	HEX	1q	148 - 164
SO355		15	245 - 271* / 241 - 269 #

* descrito por Nechtelberger et al., (2001).

descrito por Putnová et al., (2003).

As PCR foram realizadas segundo protocolo modificado de [17], totalizando um volume de 25 µl de reação, contendo: 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 2,5 mM MgCl₂, 0,8 µl de cada primer (0,4 µl *forward* e 0,4 µl *reverse*) 1,25 U Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1 x PCR buffer e 20 - 100 ng de DNA genômico.

As reações de PCR foram amplificadas em um termociclador Eppendorff®, num programa utilizado por [17], seguindo as seguintes etapas: inicialmente 1 ciclo de 10 m a 95 °C; posteriormente 27 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 1 m e 30 s a 72 °C; e finalmente 1 ciclo de 30 m a 72 °C.

2.2.7 - Quantificação do DNA total extraído

No intuito de verificarmos se as técnicas de extração utilizadas tiveram um bom resultado, ou seja, quanto à quantidade e integridade do DNA extraído, todas as amostras de DNA extraídas dos machos foram analisadas através da eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão Tris -borato-EDTA (TBE 5x), corados com Brometo de Etídeo. A quantificação de DNA dos leitões foi realizada por amostragem aleatória, na qual 12 amostras foram escolhidas, sendo divididas em 4 do início, 4 do meio e 4 do fim do período de extrações.

2.2.8 - Análise do produto da PCR

Foi realizada a genotipagem do produto da PCR no seqüenciador automático ABI 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Perkin-Elmer), utilizando-se o software Gene Scan.

2.2.9 - Análise dos resultados de identificação de paternidade

Os resultados obtidos na genotipagem foram analisados através da porcentagem de exclusão de paternidade, em relação às fêmeas, e em relação as respectivas leitegadas em que foi realizada a extração do DNA. Foram também avaliados os índices de polimorfismos existentes em cada *loco* utilizado.

3. Resultados

3.1- Comparação entre IAIC e IAIU

Em relação às 300 fêmeas analisadas neste experimento (150 fêmeas na IAIC e 150 fêmeas na IAIU), pudemos observar que as taxas médias de concepção e parição foram respectivamente, 94,7% e 90,0%, e quando comparadas entre as técnicas de IA utilizadas, ambas diferiram estatisticamente ($P < 0,05$). Seus valores foram de: 98,7% na IAIC e 90,7% na IAIU para a taxa de concepção; e para a taxa de parição tivemos como resultado 94,7% na IAIC e 85,3% na IAIU. (Figura 1).

Entretanto, o tamanho total da leitegada não diferiu entre as técnicas ($P > 0,05$), sendo de 13,7 na IAIC e de 13,0 na IAIU. Na média, para todas as fêmeas inseminadas, o total de leitões nascidos por parto foi igual 13,2.

A OP das fêmeas inseminadas não apresentou efeito significativo sobre as taxa de concepção e parição ($P > 0,05$). A taxa de concepção para fêmeas com OP igual a 2 foi de 96,7%, enquanto que para fêmeas com OP de 3-5 foi de 93,8%. A taxa de parição para as fêmeas com OP igual a 2 e 3-5 correspondeu a 90,2% e 89,9 %, respectivamente.

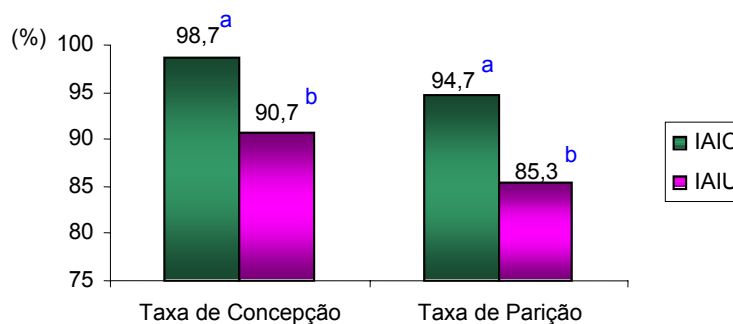


Figura 1: Taxas de concepção e parição em relação ao método de IA utilizado

IAIC: Inseminação artificial intracervical; IAIU: Inseminação artificial intra-uterina (ambas as taxas diferiram entre as técnicas por pelo menos $P < 0,05$).

O tamanho total da leitegada foi superior ($P < 0,05$) em fêmeas com 3-5 partos (13,6), em comparação com fêmeas com OP igual a 2 (12,9).

3.2- Determinação genética da Paternidade

Quanto à técnica de extração de DNA, foi possível perceber que, com o decorrer das extrações, houve um aperfeiçoamento da técnica utilizada, possibilitando a obtenção de DNA com poucas evidências de degradação, pela visualização de bandas bem definidas. A Figura 2 corresponde à análise de algumas amostras selecionadas aleatoriamente no decorrer das extrações.

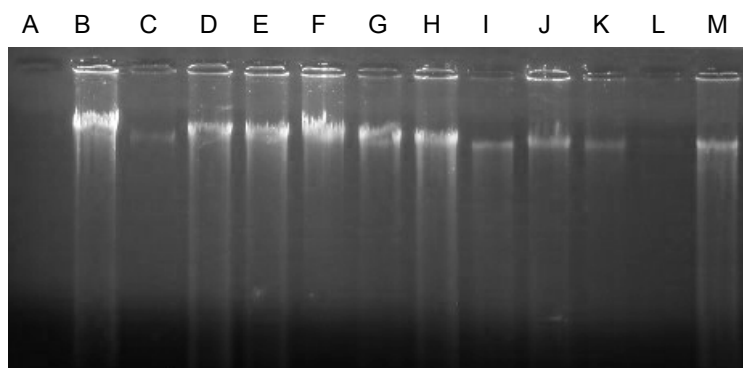


Figura 2: Análise eletroforética do DNA genômico de leitões. A - marcador λ 50 bp; B - amostra 8; C - amostra 09; D - amostra 28; E - amostra 29; F - amostra 186; G - amostra 193; H - amostra 194; I - amostra 196; J - amostra 347; K - amostra 348; L - amostra 349; M - amostra 350.

A técnica utilizada para a extração de DNA do tecido das caudas dos leitões, adaptada de [15] e [16], proporcionou extrações de ótima qualidade, para a análise e quantificação do DNA genômico extraído. Um padrão semelhante foi obtido na extração do DNA genômico do sangue dos reprodutores, a partir do protocolo adaptado por [14], sendo possível observar no gel de agarose (Figura 3), bandas muito bem delimitadas, sem a presença de degradação, e sem possíveis contaminações por restos de proteínas, RNases e/ou DNA exógenos. Ambos os protocolos de extração de DNA foram eficazes para o fornecimento de quantidade suficiente de DNA genômico de boa qualidade para a realização da PCR.

♂ 34 ♂ 41 ♂ 44 ♂ 46 ♂ 53 ♂ 92

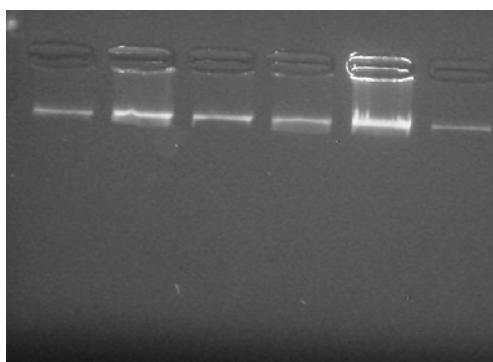


Figura 3: Análise eletroforética do DNA genômico dos reprodutores

Ambos os protocolos de extração de DNA foram eficazes para o fornecimento de quantidade suficiente de DNA genômico de boa qualidade para realizar a PCR.

Somente 7 dos 9 marcadores microssatélites utilizados no experimento, puderam ser utilizados para a determinação da paternidade (SW951, SW857, SO386, SO101, SW240, SO155, SO355). O marcador SO090 não produziu amplificação alguma na região alvo do genoma, não sendo evidenciado presença de alelos no produto da PCR. Por outro lado, o SW24 apresentou uma amplificação monomórfica, em virtude de que em todos os indivíduos, os alelos obtidos foram os mesmos (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação de polimorfismo existente entre os *loci* utilizados no experimento.

<i>Locus</i>	Nº de alelos
SW24	1
SW951	4
SW857	5
SO386	4
SO101	10
SO090	0
SW240	9
SO155	8
SO355	7

Foram utilizados como base para a exclusão da paternidade, a presença de 3 *loci* distintos para cada indivíduo analisado. Todas as 25 leitegadas analisadas, apresentaram alguns leitões dos quais não foi possível excluir a paternidade. Dos 300 leitões genotipados, foi possível excluir a paternidade em 94 (33 %), enquanto que não foi excluída a paternidade de 201 leitões (67%). Além disso, dentre as 25 leitegadas, 3 (12%) apresentaram alguns leitões nos quais a paternidade poderia ser atribuída aos 2 reprodutores incluídos no *pool* do sêmen em questão, o que ocorreu com apenas 4 leitões (Tabela 3).

Das 25 leitegadas genotipadas, 10 foram originárias da IAIC (129 leitões) e 15 da IAIU (171 leitões). A média de leitões nascidos nas leitegadas genotipadas foi de 12,0, sendo, 12,9 para a IAIC e a 11,4 para a IAIU. Seis leitegadas foram originárias do *pool* 0, uma do *pool* 1, duas do *pool* 2, duas do *pool* 3, dez do *pool* 4 e duas do *pool* 5. O macho 38 não teve atribuída a si a paternidade de nenhum leitão, por ter morrido durante o experimento, não tendo sido possível a coleta de sangue ou qualquer outro tecido que permitisse a posterior extração de seu DNA. Entre os outros reprodutores, foi possível atribuir a paternidade de 12 leitões para o macho 34, 14 para o macho 41, 46 para o macho 44, 13 para o macho 46 e 9 para o macho 92 (Tabela 4).

Tabela 3. Resultados do teste de paternidade em função do pool de sêmen avaliado, de diferentes machos e técnicas de inseminação artificial (n = 25 leitegadas)

Fêmea	IA	Total de nascidos		Machos						Leitões sem exclusão
			Pool	34	38	41	44	46	92	
4704	IC	13	2		0	7				6
4750*	IC	14	4				2		5	6
5006	IC	15	0	3	0					12
5094	IC	12	3		0				1	11
4975	IC	12	5					6	0	6
4933	IC	14	4				7		2	5
4733	IC	17	0	1	0					16
5037	IC	7	0	1	0					6
4910	IC	13	4				11		0	2
5055*	IC	12	1	0		2				8
5000	IU	10	2		0	5				5
4974*	IU	14	5					6	0	7
4741	IU	14	4				1		0	12
4932	IU	14	4				6		0	8
1237	IU	11	4				6		0	5
5048	IU	12	4				1		0	11
5051	IU	9	4				7		1	1
4998	IU	7	0	0	0					7
4716	IU	12	0	0	0					12
1185	IU	11	3		0				0	11
4936	IU	8	4				5		0	3
4726	IU	14	0	2	0					12
5060	IU	10	5					1	0	9
5035	IU	14	0	3	0					11
4732	IU	11	0	2	0					9

IA: Inseminação Artificial IC: intra-cervical; IU: intra-uterina; Pools: 0: ♂ 34 / 38; 1: ♂ 34 / 41; 2: ♂ 38 / 41; 3: ♂ 38 / 92; 4: ♂ 44 / 92; 5: ♂ 46 / 92. * fêmeas em que foram atribuídas paternidade aos 2 pais (4750 = 1 leitão); (4974 = 1 leitão); (5055 = 2 leitões).

Tabela 4. Leitões com não exclusão de paternidade por macho e método de IA

Macho	Leitões genotipados	Método de IA	
		IAIC	IAIU
34	12	5	7
38	0	0	0
41	14	9	5
44	46	20	26
46	13	6	7
92	9	8	1

Os dados da Tabela 4, indicam que a exclusão de paternidade foi semelhante entre as técnicas de IA para a maioria dos machos. A exceção foi o macho 92, para o qual, a maioria dos leitões com exclusão de paternidade foram originários de IAIC.

Entre os *pools* de sêmen, o *pool* 4 foi o que mais produziu leitões genotipados (119). Destes, foi possível excluir a paternidade de 54 leitões, com predominância de paternidade do macho 44 sobre o macho 92, tanto na IAIC (20 x 7 leitões, respectivamente), como na IAIU (26 x 2 leitões, respectivamente). O segundo *pool* de sêmen mais usado foi o *pool* 0, que produziu 97 leitões, porém como este incluía o macho 38, todos os 12 leitões com exclusão de paternidade neste *pool* eram filhos do macho 34. Foram genotipados 23 leitões a partir do *pool* 3, mas foi possível determinar a paternidade de apenas um leitão, filho do macho 92 na IAIC. Este *pool* também incluía o macho 38. No *pool* 5, foram genotipados 26 leitões, tendo sido excluída a paternidade 12 destes, todos filhos do macho 46 (6 na IAIC e 6 na IAIU), enquanto que não foi atribuída a paternidade de nenhum leitão para o macho 92. O *pool* 1 participou de apenas uma das leitegadas genotipadas, gerada por IAIC, na qual 2 dos 12 leitões foram identificados como filhos do macho 41.

Na Tabela 5, é possível observar que os alelos obtidos pela genotipagem dos reprodutores são, em muitos casos, iguais ou muito próximos uns dos outros, podendo este ser um indicador de alto grau de parentesco entre eles.

Tabela 5. Alelos referentes aos reprodutores utilizados na determinação da paternidade

Machos	SW951	SW857	SO386	SO101	SW240	SO155	SO355
34	124	151	178	202 / 212	94	164	247
41	124 / 130	153 / 157	186	198 / 212	92 / 94	164	247
44	124	153	178 / 184	212 / 218	92	164	247
46	124	153 / 155	178	212	92	152 / 160	247
92	122 / 130	155	178	212	90 / 98	166	249

4. Discussão

Em relação aos resultados obtidos na determinação da paternidade, podemos notar que os 2 protocolos utilizados para a extração do DNA genômico, foram eficazes o bastante, permitindo a obtenção de DNA em grande quantidade e qualidade para a análise em questão. O mesmo não foi observado por [19], ao utilizarem um protocolo semelhante para extração do DNA genômico do tecido de crustáceos do gênero *Lernaea*, parasitos de peixes de água doce, devido a uma grande contaminação das amostras com DNA exógeno, provavelmente do próprio hospedeiro, ou então de outros organismos que possam se prender ao corpo das fêmeas parasitas. Este resultado negativo se deve ao pouco tempo destinado à amostra na etapa de digestão das membranas celulares (fundamental para uma exposição completa do DNA), e substâncias que poderiam levar a obtenção de DNA de baixa qualidade, ou até sua completa degradação.

Entretanto, apesar do DNA obtido ter sido de boa qualidade, a determinação genética da paternidade, de uma maneira geral, não apresentou boa eficácia, em virtude de que a efetividade deste teste não depende única e exclusivamente da qualidade do DNA extraído e do número de marcadores utilizados, mas sim do nível de informação contida neles, o que lhes atribui um alto ou baixo grau de polimorfismo [21].

De um modo geral, neste experimento, os marcadores utilizados não apresentaram bons resultados na população estudada pelo fato de terem demonstrado, de maneira geral, um baixo grau de polimorfismo, acarretando, então, em uma taxa reduzida de exclusão de paternidade, apesar de todos eles serem recomendados pelo ISAG, e tidos como os ideais para a determinação de parentesco em suínos [17; 18]. Além disso, caso a região genotipada não possuir um alto grau de polimorfismo, há uma grande possibilidade de ocorrer um erro na

identificação da paternidade, levando a um resultado falso negativo e/ou positivo [22].

Outros autores [21] também obtiveram erros na identificação da paternidade de bovinos da raça Gir, utilizando 9 MS, destes, 7 recomendados pelo ISAG. Como resultado, obtiveram uma maior exclusão da paternidade com os outros 2 marcadores não recomendados pelo ISAG, sendo a paternidade excluída de reprodutores, cujos outros marcadores atribuíam falsamente a paternidade. Isto se deu, pelo fato destes marcadores selecionados apresentarem um baixo grau de polimorfismo, levando conseqüentemente a uma baixa eficácia na exclusão.

A baixa taxa da exclusão da paternidade neste experimento, poderia ser atribuída a um possível alto grau de parentesco entre os animais envolvidos no trabalho, pois em um plantel comercial existe a possibilidade de ocorrência de consangüinidade na população estudada. Porém, não se pode atribuir estes resultados somente a um alto grau de parentesco, pois a ocorrência de monomorfismo se deu apenas em um *loco* (SW24), e não na maioria, apesar de os alelos obtidos nos demais *loci* apresentarem, em sua grande maioria, valores muito próximos ou iguais. Além disso, a ocorrência deste *loco* monomórfico pode ser atribuída à presença de um gene em pressão de seleção, em virtude da realização de processos de melhoramento genético nesta população. Outra possibilidade seria a ocorrência de contaminação, o que é improvável, em função do uso de PCR multiplex em todas as amostras, e de não ter ocorrido contaminação nos demais *loci*. Além disso, é possível verificar que houve diferença no nível de polimorfismo presente em cada *loco* utilizado no trabalho (Tabela 2).

Outra possibilidade que poderia estar associada a estes resultados, seria em relação à ocorrência de mutações nos microssatélites (MS), durante a formação dos gametas. Este tipo de ocorrência é muito freqüente, principalmente em alelos de maior comprimento, podendo levar à inclusão ou exclusão de um ou mais pares de bases [22; 23]. Isto se explica pelo fato de que os MS encontram-se distribuídos ao acaso e em grande quantidade no genoma dos eucariotos e possuem repetições em *tandem* principalmente de di-nucleotídeos [24; 14], o que facilita tal ocorrência.

Possivelmente, o baixo grau de polimorfismo apresentado por estes *loci*, pode ser devido, também, à genética utilizada no experimento, a qual pode não ser necessariamente a ideal para a utilização destes marcadores. [21] demonstraram a

partir de seus resultados que, alguns *loci* utilizados com sucesso na determinação da paternidade em gado europeu, não são os mais adequados para gados zebus.

Outro resultado interessante foi em relação ao *loco* SO090, o qual não apresentou amplificação alguma em todas as amostras analisadas. Este fato pode ser atribuído a um possível erro no momento da síntese deste marcador, tanto em relação à adição, quanto a deleção de um nucleotídeo, impedindo assim, a amplificação do fragmento de DNA referente a este *loco*. Entretanto, não somente este poderia ser um único fator causador desta ocorrência, mas sim também de uma possível ocorrência de mutações no sítio de anelamento deste marcador, ou então a uma possível inserção de uma recombinação de nucleotídeos, levando a um não reconhecimento da região alvo a ser amplificada.

Ao analisarmos o número de leitões com exclusão de paternidade, em relação aos machos utilizados no experimento, podemos verificar que, no *pool* 4, que contribuiu com o maior número de amostras de sêmen, o macho 44, apresentou maior contribuição para a formação das leitegadas quando comparado ao macho 92. Um raciocínio semelhante pode ser feito na comparação entre o mesmo macho 92 e o macho 46 no *pool* 5. Assim, aparentemente, o macho 92 poderia ser um provável reprodutor de baixo desempenho reprodutivo presente numa central de IA, pois apresentou uma contribuição menor para a formação da leitegada, tanto na IAIC, quanto na IAIU, quando comparado a dois outros machos que participaram dos referentes *pools*. Sendo assim, o efeito individual deste macho, possivelmente, ficou mascarado, pela utilização da IA heterospérmica, podendo ser detectado, somente, com a utilização do teste de paternidade. Entretanto, esta hipótese não pôde ser totalmente comprovada, em virtude da ocorrência de problemas relacionados ao polimorfismo dos marcadores utilizados, não sendo possível excluir a paternidade em uma grande proporção das amostras analisadas.

O baixo grau de polimorfismo dos marcadores utilizados também não permitiu a identificação de diferenças no desempenho dos reprodutores, em função das técnicas de IA utilizadas. Os resultados obtidos no teste de campo indicaram a ocorrência de desempenho inferior com a IAIU. Autores que compararam a taxa de parição com estas duas técnicas, utilizando concentrações de 3, 2 e 1 x 10⁹ espermatozóides, observaram redução no número de leitões nascidos somente na IAIC com DI de 1 x 10⁹ espermatozóides [3], porém obtiveram resultados semelhantes para as duas técnicas, com as outras concentrações. Entretanto, a

ausência de diferenças nas taxas de concepção e parição, relatadas em outro estudo [4], não foi confirmada no presente trabalho, ainda que os dados referentes ao tamanho da leitegada tenham sido semelhantes. Em outro estudo [25], não houve diferença entre as técnicas, com relação às taxas de concepção e parição, entretanto, foi observada queda no total de leitões nascidos com IAIU, o que corresponde a um resultado inverso ao observado no presente trabalho. Ainda, outro experimento [26] relatou tamanho de leitegada inferior na IAIU, em fêmeas primíparas, sem efeito significativo de fatores como: refluxo de sêmen e sangramento durante a IA. Portanto, há uma variação considerável nos resultados de comparações executadas dentro da rotina de granjas [5;25;26] em função da dificuldade no controle de diversos fatores com potencial influência sobre o desempenho da IA, tais como; coleta, processamento, e envase da DI, a detecção do estro, e falhas na execução da técnica de IAIU no momento da IA. Em estudos realizados em condições experimentais com relativo controle de fatores externos, foi observado que o desempenho entre estas duas técnicas de IA foi semelhante, ou favoreceu a IAIU, quando DI com menor concentração espermática foram usadas [3;4;7].

A partir dos resultados obtidos neste experimento, fica claro que o teste de paternidade, apesar de ser tido como uma técnica infalível [20], e de alto grau de eficácia, apresentou, não só neste trabalho, como em outros [21;22] algumas dificuldades na determinação do desempenho reprodutivo dos reprodutores presentes em centrais de IA, de um modo geral, em virtude da ausência de um polimorfismo representativo dos marcadores na população estudada, o que levou a um baixo grau de exclusão da paternidade.

Portanto, estudos adicionais deverão continuar sendo desenvolvidos na espécie suína, com a utilização de outros marcadores, ou então, com os mesmos marcadores utilizados neste experimento, porém, em genéticas distintas, para verificar o grau de confiabilidade dos mesmos, e aperfeiçoar a técnica. Além disso, comparando o painel de marcadores utilizados neste experimento com outro painel, poderia se verificado, se realmente se trata de um problema de parentesco, de problemas em relação aos marcadores utilizados, ou então, em virtude da alta frequência de ocorrência de mutações nos *loci* utilizados, que culminaram numa baixa taxa de exclusão da paternidade.

5. Referências

- [1] ABIPECS/ ABCS. 2001. Disponível em: www.porkworld.com.br. Acesso em 02 ago. 2005.
- [2] BELSTRA, B.A. Review: Intrauterine (Transcervical) and fixed-time artificial insemination in swine. College of Agriculture & Life Sciences. Annual Swine Report. 2002.
- [3] WATSON, P; F. & BEHAN, J. R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. Theriogenology. V.57, p. 1683 – 1693. 2002.
- [4] DALLANORA, D.; MEZALIRA, A.; KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v.39, n.8, p.815-819. 2004.
- [5] ROZEBOOM, K. J.; REICKES, D. L.; WILSON, M. E. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. Journal of Animal Science. v. 82, p. 2164 - 2168, 2004.
- [6] VERBERCKMOES, S.; SOOM, A.V.; KRUIF, A. Intra-uterine insemination in Farm Animals and Humans. Reproduction in Domestic Animals. v. 39, p. 195 - 204, 2004.
- [7] MEZALIRA, A.; DALLANORA, D; SCHMIDT, A C.T; et al. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas de acordo com o macho utilizado na inseminação intra-uterina. XI Congresso Brasileiro de Veterinários especialistas em suínos. Anais. Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2003.
- [8] VESSEUR, P.C.; KEMP, B.; HARTOG, L.A. Factors influencing the proportion of offspring from second insemination in sows. Animal Reproduction Science. V. 41, p. 255 - 265, 1996.
- [9] POPWELL, J.M.; FLOWERS, W.L. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. Animal Reproduction Science. v.81, p.97–113, 2004
- [10] DZIUK, P.J. Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. Animal Reproduction Science. v.43; p. 65-88; 1996.
- [11] STAHLBERG, R; HARLIZIUS, B.; WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. Theriogenology. V. 53, p. 1365 - 1373, 2000.
- [12] DIAL, G.D., MARSH, W.E., POLSON, D.D., VAILLANCOURT, J-P. Reproductive failure: differential diagnosis. In: LEMAN, A.D., STRAW, B.E., MENGELING,

- W.L., D'ALLAIRE, S., TAYLOR, D.J. Ed. **Diseases of swine**, 7th Ed. Iowa State University Press. Ames, IA-USA. 1992; p. 88-137.
- [13] STATISTIX®. 2003. Statistix® 8 Analytical software. Tallahassee, FL.
- [14] REGITANO, L., C., A. Extração de DNA para Aplicação em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). In: REGITANO, L., C., A.; COUTINHO, L., L. *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*, p. 179 - 194, 2001.
- [15] DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*.v.19: 11-151987.
- [16] BLACK IV, W.C; KLOMPEN, J.SH.; KEIRANS, J.E. Phylogenetic Relationships among Tick Subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) Based on the 18S Nuclear rDNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 7, nº 1, p. 120 -144, 1997.
- [17] NECHTELBERGER, D.; KALTWASSER, C; MEYER, S., J.,N. *et.al.* DNA Microsatellite analysis for parentage control in Austrian pigs. *Animal Biotechnology*. v. 12 (2), p. 141-144, 2001.
- [18] PUTNOVÁ, L.; KNOLL, A.; DVORAK, V.; DVORAK, J. A novel porcine microsatellite panel for the indentification of individuals and parentage control in the Czech Republic. *Czech. Journal Science*. V. 48, issue (8) p. 307-314, 2003
- [19] VALENTIM, M.; VARGAS, L.; MOREIRA, H.M.; RIBEIRO, R.P. Comparação de protocolos para extração do DNA de *Lernaea* sp. (Copepoda: Cyclopoida). *Acta Scientiarum, Animal Sciences*. V. 25, p. 219-222, 2003.
- [20] CURI, R.A.; LOPES, C.R. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequencu in a population of Gyr breed bovines. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science* v. 39, n.3, p. 129-135, 2002.
- [21] RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M.; EZRA, E.; WELLER, J.I. Misidentification rate in the Israeli Dairy Cattle Population and its implication for Genetic Improvement. *Journal of Dairy Science*. v. 79, p. 676-681. 1995.
- [22] XU, X.; PENG, M.; FANG, Z.; XU, X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele lenght. *Nature Genetics* v. 24, p. 396-399, 2000.
- [23] DAWID, A.P.; MORTERA, J.; DOBOSZ, M.; PASCALI, V.L. Mutations and the probabilistic approach to incompatible paternity tests. *International Congress Series*. v. 1239; p. 637-638; 2003.
- [24] GRATTAPAGLIA, D. Testes de DNA para maciez da carne. IV Simpósio Nacional das Raças Simental e Simbrasil. Disponível em: www.simentalsimbrasil.com.br/simposios/2004/palest_testesdna.htm Acesso em 26/02/2006
- [25] ROBERTS, P. K. & BILKEI, G. Field experiences on Post-cervical artificial insemination in the sow. *Reproduction of Domestic Animals*. v. 40, p. 489 - 491, 2005.
- [26] SERRET, C.G., ALVARENGA, M.V.F., CÓRIA, A.L.P., DIAS, C.P., CORCINI, C.D., CORRÊA. M.N., DESCHAMPS, J.C., BIANCHI, I. AND LUCIA, T. Jr. Intrauterine artificial insemination in female swine with distinct sperm concentrations, parities and methods of ovulation estimation. *Animal Reproduction*. Aceito para publicação. 2006

Conclusão

Em condições de rotina de campo, a técnica de inseminação artificial intra-uterina apresentou desempenho inferior ao obtido com inseminação artificial intracervical.

Apesar do teste de paternidade apresentar alto grau de exclusão, este pode se apresentar variável, de acordo com o grau de polimorfismo presente nos *loci* selecionados, em relação à espécie, genética e / ou linhagem em questão.

Neste experimento, não foi possível obtermos resultados concretos em termos de desempenho reprodutivo dos machos suínos, em relação às técnicas de IA utilizadas, devido ao baixo grau de exclusão da paternidade.

Referências

ABIPECS/ ABCS. 2001. Disponível em: www.porkworld.com.br. Acesso em 02 ago. 2005.

ALBRECHT, A.; CAVIA, R.; LARRABURU, G.; MIGLIARO, F. G.; BROGLIATTI, G. Heterospermic insemination at two sperm concentration in timed AI: Casa semen parameters and pregnancy rates. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 17; nº 2; p. 154-155 (Supl), 2004.

BELSTRA, B.A. Review: Intrauterine (Transcervical) and fixed-time artificial insemination in swine. College of Agriculture & Life Sciences. **Annual Swine Report**. 2002.

BENNEMANN, P.E.; MILBRADT, E.; DIEHL, G. N. et al. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas submetidas à Inseminação Intrauterina com 1 e 2×10^9 espermatozóides em diferentes intervalos pré-ovulatórios. XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 2003 **Anais**. Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2003.

BENNEMANN, P.E; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Avaliação do custo de doses inseminantes em centrais de inseminação artificial de suínos em sistema aberto. XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 2003. **Anais**. Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2003.

BERGER, T & PARKER, K. Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. **Gamete Research**.v. 22; Issue 4, p. 385-397 1988 (Abstract).

BLACK IV, W.C; KLOMPEN, J.SH.; KEIRANS, J.E. Phylogenetic Relationships among Tick Subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) Based on the 18S Nuclear rDNA gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 7, nº 1, p. 120-144, 1997.

BORTOLOZZO, F.P. Implicações da duração do estro e momento da ovulação na eficiência reprodutiva de suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 6. 1993 **Anais**. Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1993.

BORTOLOZZO, F.P. & WENTZ, I. Incremento da eficiência reprodutiva em programa de inseminação artificial (IA) no suíno. 11º CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 1995 **Anais** (Belo Horizonte, Brasil) pp. 131-141 In: 1995.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta Scientiae Veterinarie**. v.33(1): 17-32, 2005.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; NETO, G.B. **Inseminação Artificial na suinocultura tecnificada**. 1.ed. Porto Alegre: Pallotti, 2005. 185p.

BOWLING, A.T.; EGGLESTON-STOTT, M.L.; BYRNS, G.; DILEANIS, S.; WICTUM, E. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. **Animal Genetics**. v.28, p. 247-252, 1997.

CESCONETO, R.J.; SILVEIRA, P.R.S.; ZANELLA, E.L. Identificação de Paternidade para avaliação da contribuição das doses inseminantes na composição da leitegada suína. XI CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. 2003 **Anais**. Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2003p. 237-238.

CESCONETO, R.J. **Identificação de paternidade para a avaliação da contribuição da primeira e segunda dose inseminante na composição da leitegada suína**. 2003. Dissertação (Mestre em Manejo Reprodutivo Animal). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CORRÊA, M, N.; MEINCKE, W.; LUCIA, T. JR.; DESCHAMPS, J, C. **Fisiologia e Manejo Reprodutivo da Fêmea Suína**. In: Inseminação Artificial em Suínos. 1. ed: Printpar, 2001, p. 34 – 66.

CURI, R.A.; LOPES, C.R. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequencu in a population of Gyr breed bovines. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science** v. 39, n.3, p. 129-135, 2002.

DALLANORA, D.; MEZALIRA, A.; KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.39, n.8, p.815-819. 2004.

DALLANORA, D.; MEZALIRA, A; KATZER, LH *et al.* Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas com deposição intrauterina de sêmen e reduzido número de espermatozoides. Congresso Brasileiro de Veterinários especialistas em suínos. **Anais**. Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2003.

DALLANORA, D.; MEZALIRA, A; KATZER, LH *et al.* Volume e número de espermatozoides no refluxo de fêmeas suínas após inseminação intrauterina. Congresso Brasileiro de Veterinários especialistas em suínos. **Anais**. Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2003.

DAVIS, A.P; GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. Homospermic versus heterospermic insemination of zona-free hamster eggs to assess fertility of fluorochrome-labeled acrosome-reacted bull spermatozoa. **Gamete Research**. v.17; Issue 4; p. 343 - 354; 2005 (Abstract).

DAWID, A.P.; MORTERA, J.; DOBOSZ, M.; PASCALI, V.L. Mutations and the probabilistic approach to incompatible paternity tests. **International Congress Series**. v. 1239; p. 637-638; 2003.

DIAL, G.D., MARSH, W.E., POLSON, D.D., VAILLANCOURT, J-P. Reproductive failure: differential diagnosis. In: LEMAN, A.D., STRAW, B.E., MENGELING, W.L., D'ALLAIRE, S., TAYLOR, D.J. Ed. **Diseases of swine**, 7th Ed. Iowa State University Press. Ames, IA-USA. 1992; p. 88-137.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**.v.19: 11-15 1987.

DZIUK, P.J. Factors that influence the proportion of offspring sired by a male following heterospermic insemination. **Animal Reproduction Science**. v.43; p. 65-88; 1996.

FANG, M.; HU, X.; JIANG, T.; BRAUNSCHEWELG, M.; HU, L.; DU, Z.; FENG, J.; ZHANG, Q.; WU, C.; LI, N. The phylogeny of Chinese indigenous pig breeds inferred from microsatellite markers. **Animal Genetics**. v. 36, p. 7-13, 2005.

FAO Database 2002. Disponível em: <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture>. Acessado em 02/02/2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares em el analisis genético**. Embrapa, Brasília-DF, 1998. 205p.

FLINT, A.F.; CHAPMAN, P.L.; SEIDEL, Jr., G.E. Fertility assessment through heterospermic insemination of flow-sorted in cattle. **Journal of Animal Science**. v. 81, p. 1814 - 1822, 2003.

GERRITS, R.J.; LUNNEY, J.K.; JOHNSON, L.A.; PURSEL, V.G.; KRAELING, R.R.; ROHRER, G.A.; DOBRINSKY, J.R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**. v. 63, p. 283 - 299, 2005.

GRATTAPAGLIA, D. Testes de DNA para maciez da carne. IV Simpósio Nacional das Raças Simental e Simbrasil. Disponível em: www.simentalsimbrasil.com.br/simposios/2004/palest_testesdna.htm Acesso em 26/02/2006.

ICHIKAWA, Y.; TAKAGI, K.; TSUMAGARI, S.; ISHIHAMA, K.; MORITA, M.; KANEMAKI, M.; TAKEISHI, M.; TAKAHASHI, H. Canine parentage testing based on microsatellite polymorphisms. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 63 (11), p. 1209-1213, 2001.

LANGENDIJK, P.; SOEDE, N.M.; KEMP, B. Uterine activity, sperm transport, and the role of boar stimuli around insemination in sows. **Theriogenology**. v. 63; p. 500 – 513; 2005.

LI, S.J.; YANG, S.H.; ZHAO, S.H.; FAN, B.; YU, M.; WANG, H.S.; LI, M.H.; LIU, B.; XIONG, T.A.; LI, K. Genetic diversity analyses of 10 indigenous Chinese pig populations based on 20 microsatellites. **Journal of Animal Science**. v. 82, p. 368-374, 2004.

LUCIA, T.JR. Eficiência Reprodutiva em Fêmeas Suínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 1, p. 21-33, 1999.

MACEDO, M.C.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA, T. JR.; BORDIGNON, J.; SERRET, C.G.; RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHIMITT, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. **Animal Reproduction Science**. 2006. No prelo.

MARTINEZ, E, A; CAAMAÑO, J, N; GIL, M, A; *et al.* Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. **Theriogenology**. v.61; p. 137 – 146; 2004.

MARTIN, P.A.; DZIUK, P.J. Assesment of relative fertility of males (cockerels and boars) by competitive mating. **Jounal of Reproduction and Fertility**. v.49; p 323 - 329; 1977.

MEZALIRA, A.; DALLANORA, D; SCHMIDT,A. C.T; *et al.* Inseminação intrauterina com redução no volume e número de espermatozóides. XI Congresso Brasileiro de Veterinários especialistas em suínos **Anais**. Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2003.

MEZALIRA, A.; DALLANORA, D; SCHMIDT,A. C.T; *et al.* Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas de acordo com o macho utilizado na inseminação

intra-uterina. XI Congresso Brasileiro de Veterinários especialistas em suínos. **Anais**. Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2003.

MOMMENS, G.; ZEVEREN, A.V.; PEELMAN, L.J. Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity cases in American bison, *Bison bison* L. **Animal Genetics**. v. 29, p. 12-18, 1998.

MONTALDO, H.H.; MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.1 n.2, p. 83 - 89, 1998.

NECHTELBERGER, D.; KALTWASSER, C; MEYER, S., J.,N. *et.al*. DNA Microsatellite analysis for parentage control in Austrian pigs. **Animal Biotechnology**. v. 12 (2), p. 141-144, 2001.

OLIVEIRA, D.A.A.; KUABARA, M.Y. Fidedignidade da genealogia e sua importância para o melhoramento animal. In: PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. Belo Horizonte, p. 374-381, 1999.

PASSAGLIA, L.M.P & ZAHA, A. Técnicas de Biologia Molecular. In: ZAHA, A.; SCHRANK, A.; LORETO, E.L.S.; ET.AL. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre, Mercado Aberto, 2003. p. 379-413.

PENACINO, G.; SALA, A.; CORACH, D. Are DNA tests infallible? **International Congress Series**. v. 1239, p. 873-877, 2003.

POPWELL, J.M.; FLOWERS, W.L. Variability in relationships between semen quality and estimates of in vivo and in vitro fertility in boars. **Animal Reproduction Science**. v.81, p.97-113, 2004

PUTNOVÁ, L.; KNOLL, A.; DVORAK, V.; DVORAK, J. A novel porcine microsatellite panel for the identification of individuals and parentage control in the Czech Republic. **Czech. Journal Science**. V. 48, issue (8) p. 307-314, 2003

RATH, D. Low dose insemination in the Sow – A Review. **Reproduction of Domestic Animals** v. 37, p. 201 – 205, 2002.

REGITANO, L., C., A. Extração de DNA para Aplicação em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). In: REGITANO, L., C., A.; COUTINHO, L., L. **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**, p. 179 - 194, 2001.

ROBERTS, P. K. & BILKEI, G. Field experiences on Post-cervical artificial insemination in the sow. **Reproduction of Domestic Animals**. v. 40, p. 489 - 491, 2005.

ROBINSON, J.A.B.; BUHR, M.M. Impact of genetic selection on management of boar replacement. **Theriogenology**. v. 63, p. 668 - 678, 2005.

ROCA, J.; CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; LUCAS, X.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A. Fertility of cryopreserved boar spermatozoa after transcervical deep intrauterine insemination. **Theriogenology**. v. 57, p.385, 2002. (Suplem.)

ROCA, J.; CARVAJAL, G.; LUCAS, X. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**. v. 60, p. 77 – 87, 2003.

ROHRER, G.A.; VöGELI, P.; STRANZINGER, G.; ALEXANDER, L.J.; BEATTIE, C.W. Mapping 28 erythrocyte antigen, plasma protein and enzyme polymorphisms using an efficient genomic scan of the porcine genome. **Animal Genetics**. v. 28, p. 323-330, 1997.

RON, M.; BLANC, Y.; BAND, M.; EZRA, E.; WELLER, J.I. Misidentification rate in the Israeli Dairy Cattle Population and its implication for Genetic Improvement. **Journal of Dairy Science**. v. 79, p. 676-681. 1995.

ROZEBOOM, K. J.; REICKES, D. L.; WILSON, M. E. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. **Journal of Animal Science**. v. 82, p. 2164 - 2168, 2004.

SARAIVA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; MARTINEZ, H. R. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. **Theriogenology**. v. 63, p. 1320 - 1333, 2005.

SCANDURA, M. The use of microsatellites in the study of social structure in large mammals: italian wolf and fallow deer as case studies. PhD Thesis. University of Bielefeld, Faculty of Biology, 2004.

SERRET, C.G., ALVARENGA, M.V.F., CÓRIA, A.L.P., DIAS, C.P., CORCINI, C.D., CORRÊA, M.N., DESCHAMPS, J.C., BIANCHI, I. AND LUCIA, T. Jr. Intrauterine artificial insemination in female swine with distinct sperm concentrations, parities and methods of ovulation estimation. **Animal Reproduction**. Aceito para publicação. 2006.

SHWARZ, S.; PRESUHN, U.; KALM, E.; REINSCH, N. Characterizing polymorphism and multiplex feasibility of 142 microsatellite markers from a commercial German Landrace line. **Archieve of Tierzucht**. v. 48, p. 490-493, 2005. (short comunication)

SILVEIRA, P. R. S.; MUNAN, J.; SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I. Comparação entre monta natural e inseminação artificial na espécie suína. **CT /15 / Embrapa - CNPSA**, p. 1 - 2, 1980.

Sociedade Rural do Paraná. Fato Rural. In: DNA: uma alternativa real para determinação da paternidade em animais. Disponível em : www.srp.com.br/page-publicacoes.asp?id2=415 . Acessado em 26/02/2006.

STAHLBERG, R; HARLIZIUS, B.; WEITZE, K.F.; WABERSKI, D. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. **Theriogenology**. V. 53, p. 1365 - 1373, 2000.

STEVERINK, D.W.B.; SOEDE, N.M.; BOUWMAN, E.G.; KEMP, B. Semen backflow after insemination and its effects on fertilization results in sows. **Animal Reproduction Science**. v.54, p.109 -119, 1998.

TOZAKI, T.; KAKOI, H.; MASHIMA, S.; HIROTA, K.; HASEGAWA, T.; ISHIDA, N.; MIURA, N.; CHOI-MIURA, N.; TOMITA, M. Population study and validation of paternity testing for thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v. 63 (11), p. 1191-1197, 2001.

VALENTIM, M.; VARGAS, L.; MOREIRA, H.M.; RIBEIRO, R.P. Comparação de protocolos para extração do DNA de *Lernaea* sp. (Copepoda: Cyclopoida). **Acta Scientiarum, Animal Sciences**. V. 25, p. 219-222, 2003.

VAN DONGEN, W.F.D.; MULDER, R.A. Isolation and characterization of microsatellite markers for paternity assesment in the golden whistler (*Pachycephala pectoralis*: Aves). **Molecular Ecology Notes**. v. 5; p. 5-6, 2005.

VAZQUEZ, J. M; MARTINEZ, E, A; PARRILLA, I. et al. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**. V.59; p. 1605 – 1614, 2003.

VERBERCKMOES, S.; SOOM, A.V.; KRUIF, A. Intra-uterine insemination in Farm Animals and Humans. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 39, p. 195 - 204, 2004.

VESSEUR, P.C.; KEMP, B.; HARTOG, L.A. Factors influencing the proportion of offspring from second insemination in sows. **Animal Reproduction Science**. V. 41, p. 255 - 265, 1996.

VIANA, C.H.C. **Relações entre as características intervalo desmame – cio, duração do cio e momento de ovulação pela ultra-sonografia e dosagem de progesterona sérica em fêmeas da espécie suína**. 1998. Dissertação (Mestre em Reprodução Animal). Universidade de São Paulo, São Paulo.

VIGILANT, L.; HOFREITER, M.; SIEDEL, H.; BOESCH, C. Paternity and relatedness in wild chimpanzee communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 98, n. 23, p. 12890-12895, 2001.

XU, X.; PENG, M.; FANG, Z.; XU, X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. **Nature Genetics** v. 24, p. 396-399, 2000.

WATSON, P; F. & BEHAN, J. R. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. **Theriogenology**. V.57, p. 1683 – 1693. 2002.

ZEOCHINI, M.; BARBIERI, S.; CHIESA, F. Miglioramento delle prestazioni produttive e riproduttive mediante nuove tecniche di inseminazione strumentale nella suola. **Quaderni della Ricerca**. v. 40, p. 03-18, 2004.

Anexos

Anexo 1: Protocolo de extração de DNA de sangue fresco

➤ Obtenção de Leucócitos

- ❖ Pegar 500 µl de sangue, do tubo Vacutainer de 5ml com EDTA potássico (50 µl -K₃ a 15 %);
- ❖ Colocá-lo em tubo eppendorf de 1,5 ml;
- ❖ Adicionar 1 ml do Tampão de hemólise (Solução A), no intuito de lisar os glóbulos vermelhos, homogeneizar bem por inversão (várias vezes);
- ❖ Centrifugar em 14.000 RPM por 10 minutos
Obs: se formar *pellet* muito pequeno recentrifugar
- ❖ Posteriormente, descartar o sobrenadante, permanecendo somente com o *pellet* de glóbulos brancos;
- ❖ Resuspender este pellet com 1 ml da Solução A e centrifugar em 14.000 RPM por 10 minutos.

Obs: Repetir esta etapa cerca de 10 vezes, no intuito de que o pellet fique bem limpo “branquinho”, ou seja, sem a presença de resquícios de glóbulos vermelhos, obtendo-se somente os glóbulos brancos;

- ❖ O pellet de glóbulos brancos pode ser armazenado no freezer por vários meses, sem ser danificado.

➤ Extração do DNA

- ❖ Resuspender o *pellet* em 498 µl de Solução B (tampão detergente);

- ❖ Posteriormente adicionar 2 µl de Proteinase K, homogeneizar bem;
- ❖ Incubar a amostra a 55 °C até dissolver bem o *pellet* (4-6 horas ou *overnight*), homogeneizando sempre;
- ❖ Posteriormente adicionar 500 µl de Solução B e 316 µl de NaCl (5M);
- ❖ Centrifugar em 14.000 RPM por 15 minutos.
- ❖ Transferir o sobrenadante, no máximo 500 µl, para tubo eppendorf novo esterilizado;
- ❖ Posteriormente, adicionar 1 ml de etanol absoluto (100 %) gelado, inverter o tubo várias vezes
- ❖ Centrifugar em 14.000 RPM por 15 min;
- ❖ Descartar o sobrenadante, adicionar então 200 µl de etanol 70 % gelado;
- ❖ Centrifugar em 14.000 RPM por 15 min;
- ❖ Descartar o sobrenadante, deixar sair bem o cheiro do álcool;
- ❖ Posteriormente resuspender o *pellet* em 250 µl de TE (tampão de eluição).
- ❖ Armazenar a amostra em freezer por vários meses.

Solução A (25 ml)

- 250 µl de Tris. Cl pH 7,6 1M ([] final 10 mM)
- 250 µl de MgCl₂ 0,5 M ([] final 5 mM)
- 50 µl NaCl 5M ([] final 10 mM)
- completar com H₂O pura.

Solução B (500 µl)

- 5 µl de Tris.Cl pH 8,0 1M (final de 10mM)
- 10 µl de NaCl 5M
- 10 µl EDTA pH 8,0 0,5M
- 12,5 µl SDS 20 %
- completar com H₂O pura.

Anexo 2: Protocolo extração e purificação do DNA da cauda dos leitões

➤ Manipulação da Amostra

- ✓ Retirar a amostra do álcool 70%;
- ✓ Retirar as sujidades da cauda com gaze;
- ✓ Cortar uma porção da cauda a ser processada;
- ✓ Colocar o fragmento da cauda a ser processado sobre papel toalha, identificá-lo, cobri-lo e colocá-lo na estufa a 37 °C por 10 min;
- ✓ Retirar o fragmento de cauda da estufa.

➤ Purificação e Extração do DNA

- ✓ Pesar 30 mg de tecido já seco pela estufa;
- ✓ Posteriormente retirar a pele da cauda e retirar somente tecido muscular para o processamento;
- ✓ Após retirar a quantia necessária de tecido muscular, colocá-lo em tubo *ependorf* de 1,5 ml;
- ✓ Adicionar então 500 µl de tampão CTAB;
- ✓ Colocar em banho-maria à 65° C e macerar bem até ficar bem diluído;
- ✓ Adicionar 2 µl de β- mercaptoetanol a 2%, após a amostra estar 1 h no banho-maria e macerar mais um pouco;
- ✓ Posteriormente deixar agindo por 30 min. à temperatura ambiente;
- ✓ Adicionar 4 µl de Proteinase K;
- ✓ Colocar em banho-maria à 45° C por 1 h (sempre homogeneizando);
- ✓ Posteriormente adicionar 1 µl de RNase;

- ✓ Aumentar o banho-maria para 55° C e deixar a amostra *overnight* - $\pm$ 16 h (sempre homogeneizando);
 - ✓ Adicionar Fenol-Clorofórmio no mesmo volume da amostra total, homogeneizar bem - formação de uma amostra “leitosa”;
 - ✓ Centrifugar em 13.000 RPM por 10 min;

 - ✓ Após esta centrifugação formará 3 fases no *ependorf*:
 - Fase Aquosa (superior)*
 - Fase Intermediária
 - Fase Fenol (inferior)
 - ✓ Transferir somente a Fase Aquosa (superior)* para um *ependorf* novo esterilizado;
 - ✓ Adicionar 2/3 do volume total transferido de isopropanol a 100% (inverter várias vezes);
 - ✓ Deixar a solução descansar por 1 h à -20° C (*freezer*);
 - ✓ Posteriormente centrifugar a 13.000 RPM por 6 min.;
 - ✓ Descartar o sobrenadante e colocar o *ependorf* aberto na estufa à 45° C por 30 min., no intuito de que saia todo álcool presente e permaneça somente o *pellet*;
 - ✓ Após isto, resuspender o *pellet* em 350 µl de NaCl à 1M (homogeneizar);
 - ✓ Adicionar então 1.100 µl de etanol a 100% (homogeneizar);
 - ✓ Centrifugar a 13.000 RPM por 13 min;
 - ✓ Descartar o sobrenadante, no intuito de retirar o excesso do etanol;
 - ✓ Adicionar 500 µl de etanol a 70%, no intuito de retirar o excesso de sal;
 - ✓ Centrifugar a 13.000RPM por 3 min.;
 - ✓ Descartar o sobrenadante e deixar secar até sair o cheiro do etanol;
 - ✓ Posteriormente resuspender o *pellet* em 50 µl de TE (tampão de eluição).
- Verificação em Gel de Agarose
- ✓ Correr amostra em gel de agarose a 0,8 % no intuito de verificarmos se há qualidade no DNA extraído.

Tampão CTAB: (para 1 litro)

- 100 ml of 1 M Tris, pH 8.0
- 280 ml of 5 M NaCl
- 40 ml of 0.5 M EDTA
- 20 g of CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide)

TE buffer: (para 1 litro)

[Final]

- 10 mM 10 ml de 1 M Tris, pH 8.0
- 1 mM 2 ml de 0.5 M EDTA

Tris 1 M, pH 8,0: (para 1 litro)

- 121,1 g Tris
- 700 ml H₂O destilada
- Dissolver a mistura
- Adicionar HCL concentrado até o pH atingir 8,0 (cerca de 50 ml)
- Completar com H₂O destilada até completar 1 litro.

EDTA 0.5 M pH 8,0: (para 1 litro)

- 186.12 g of EDTA
- 750 ml H₂O destilada
- Adicionar cerca de 20 g de NaOH em *pellet*

Obs: Cuidadosamente adicione mais NaOH até que o pH atinja 8,0. O EDTA não se dissolve até que o pH fique próximo de 8,0.

5 M NaCl: (para 1 litro)

- 292,2 g of NaCl
- 700 ml H₂O destilada
- Misturar e adicionar mais H₂O destilada até atingir 1 litro.